

ISSN 1726-9784



# Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



**Russian Journal  
of Biotherapy**

**1**

ТОМ 18  
2019



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); **Н.Д. Бунятян**, д-р фарм. 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**, д-р 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); **А.Ю. Петров**, д-р фарм. наук, проф. (Екатеринбург, 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); **И.Ж. Шубина**, д-р биол. наук (Москва, Россия); **И.В. Уласов**, д-р биол. наук (Сиэтл, США); **Р.И. Якубовская**, д-р биол. наук, проф. (Москва, Россия)

ОСНОВАН В 2002 г. ПРОФЕССОРОМ А.Ю. БАРЫШНИКОВЫМ

1  
ТОМ 18  
'19

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  
rbjournal@ronc.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](http://www.abvpress.ru)

*Редактор В.Е. Ефремова  
Корректор М.С. Пахомова  
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. 2019. Том 18. № 1. 1–100  
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2019  
Подписной индекс в каталоге  
агентства «Роспечать» – 81679  
Отпечатано в типографии  
ООО «Медиаколор»  
Тираж 1000 экз.  
<http://www.ronc.ru/specialists/usefull/journals/138/>  
<http://bioterapevt.elpub.ru/jour/index>



Екатеринбург

Россия

## 4-Я РОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ MEDCHEM RUSSIA 2019

9–14  
ИЮНЯ  
2019

### **Дорогие друзья и коллеги!**

Организационный комитет конференции МедХим-Россия 2019 сердечно приглашает академических и университетских исследователей, зарубежных ученых, представителей фармацевтического бизнеса и медицины, аспирантов и студентов посетить 4-ю Российскую конференцию по медицинской химии.

Конференция проводится в рамках XXI Менделеевского съезда по общей и прикладной химии.

**ДАТЫ ПРОВЕДЕНИЯ:** 9–14 июня 2019 года

**МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ:** Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина – УрФУ, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19.  
Институт физики металлов им. М.Н. Михеева УрО РАН, –  
ИФМ УрО РАН, г. Екатеринбург, ул. С. Ковалевской, 18

### **ПРОГРАММА**

Программа конференции включает в себя пленарные лекции, устные доклады, постерную сессию, молодежную школу-конференцию по медицинской химии, а также дискуссии в рамках круглых столов.

Научная программа охватывает следующие темы:

- Инновационные разработки в актуальных терапевтических областях;
- Новые синтетические и технологические подходы в медицинской химии;
- Компьютерное прогнозирование, виртуальный скрининг, био- и хемоинформатика;
- Нанокompозиты, системы доставки лекарств;
- Разработка инновационных противоопухолевых препаратов;
- Новые материалы для медицины;
- Клеточные технологии, разработка биофармацевтических препаратов.

### **САТЕЛЛИТНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ:**

XVI Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Новые отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы»

Сайт – <http://medchem2019.uran.ru>

**Будем рады видеть Вас в Екатеринбурге!**

---

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 Institution "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Research Institute of Experimental Diagnostic and Therapy of Tumors

## EDITOR-IN-CHIEF

**Z.S. Shprakh**, PhD

## DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

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

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

## EDITORIAL BOARD

**I.A. Baldueva**, PhD, DSc (Saint Petersburg, Russia); **O.A. Bocharova**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **N.D. Bunyatyan**, PhD, DSc, Professor (Moscow); **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, DSc (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); **A.Yu. Petrov**, PhD, DSc, Professor (Ekaterinburg, Russia); **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); **I.Zh. Shubina**, PhD, DSc (Moscow, Russia); **I.V. Ulasov**, PhD (Seattle, USA); **R.I. Yakubovskaya**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia)

FOUNDED IN 2002 BY PROFESSOR A.YU. BARYSHNIKOV

1  
VOL. 18  
'19

FSBI "N.N. Blokhin National Medical Research Oncology Center" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 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](mailto:biotherapy_rbj@mail.ru)  
[rbjournal@ronc.ru](mailto:rbjournal@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](mailto:abv@abvpress.ru)  
[www.abvpress.ru](http://www.abvpress.ru)

*Editor* V.E. Efreмова  
*Proofreaders* M.S. Pakhomova  
*Designer* E.V. Stepanova  
*Maker-up* O.V. Goncharuk

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

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

ISSN 1726-9784  
Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal. 2019. Volume 18. No1. 1–100  
© PH "ABV-Press", 2019  
Rospechat" catalogue index: 81679  
Printed at the Mediacolor LLC  
1,000 copies

<https://www.ronc.ru/specialists/useful/journals/138/>  
<http://bioterapevt.elpub.ru/jour/index>

## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

- М.А. Сеньчукова, Е.В. Макарова, Е.А. Калинин, В.В. Ткачев*  
**Современные представления о происхождении, особенностях морфологии, прогностической и предиктивной значимости опухолевых сосудов** ..... 6
- Д.Л. Ротин, К.С. Титов, А.М. Казаков*  
**Васкулогенная мимикрия при меланоме: молекулярные механизмы и клиническое значение** ..... 16
- Е.Л. Комарова, С.В. Чернова, К.В. Касумова, М.С. Табачная, Л.В. Овсянникова, К.И. Эллер*  
**Хондроитина сульфат натрия – примеси и проблемы стандартизации (обзор литературы)** ..... 25

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Г.М. Волгарева, В.Д. Ермилова*  
**Обнаружение онкогена E7 вируса папилломы человека 18-го типа у больных раком предстательной железы** ..... 37
- С.С. Шушианов, Т.А. Кравцова, А.В. Вайман, Н.П. Акентьева, Ю.Б. Черных*  
**Гиперэкспрессия IGF-1 – неблагоприятный прогностический фактор при множественной миеломе** ..... 42
- А.А. Солодовник, А.С. Мкртчян, В.А. Мисюрин, Л.А. Кесаева, Н.Н. Касаткина, О.М. Вотякова, О.Ю. Якимович, Е.Г. Медведовская, А.С. Антипова, И.З. Заводнова, О.А. Коломейцев, А.Д. Ширин, Е.А. Османов, А.В. Мисюрин*  
**Комплексное цитогенетическое исследование хромосомных aberrаций у больных множественной миеломой** ..... 50
- Т.М. Соколова, В.В. Полосков, А.Н. Шувалов, О.С. Бурова, З.А. Соколова*  
**Сигнальные TLR/RLR-механизмы иммуномодулирующего действия препаратов ингавирин и тимоген** ..... 60
- Е.А. Шестакова, Т.А. Богуш*  
**BRCA1 участвует в экспрессии некодирующей РНК XIST** ..... 67
- В.А. Голибродо, И.Д. Трещалин, А.Е. Шекотихин, Э.Р. Переверзева*  
**Нейротоксические свойства противоопухолевого препарата антрафурана** ..... 75
- О.И. Коняева, Н.Ю. Кульбачевская, В.А. Чалей, Н.П. Ермакова, И.Б. Меркулова, Т.В. Абрамова, И.С. Касаткина*  
**Эквитоксичность отечественного гидроксикарбамида и препарата сравнения гидреа на крысах** ..... 80
- Е.В. Блынская, С.В. Тишков, К.В. Алексеев, С.В. Минаев*  
**Стадия термоциклирования в оптимизации процессов замораживания в технологии получения лиофилизированного препарата** ..... 87
- Е.В. Игнатьева, З.С. Шпрах, И.В. Ярцева, Е.В. Санарова*  
**Тест «Растворение» как элемент комплексной оценки качества капсул, содержащих секоизоларицирезинол** ..... 95

## REVIEWS

- M.A. Senchukova, E.V. Makarova, E.A. Kalinin, V.V. Tkachev*  
**Modern ideas about the origin, features of morphology, prognostic and predictive significance of tumor vessels** . . . . . 6
- D.L. Rotin, K.S. Titov, A.M. Kazakov*  
**Vasculogenic mimicry in melanoma: molecular mechanisms and clinical significance** . . . . . 16
- E.L. Komarova, S.V. Chernova, K.V. Kasumova, M.S. Tabachnaya, L.V. Ovsyannikova, K.I. Eller*  
**Chondroitin sodium sulfate – impurities and standardization problems (literature review)** . . . . . 25

## ORIGINAL REPORTS

- G.M. Volgareva, V.D. Ermilova*  
**Detection of human papillomavirus type 18 oncogen *E7* in patients with prostate cancer** . . . . . 37
- S.S. Shushanov, T.A. Kravtsova, A.V. Vaiman, N.P. Akentieva, Yu.B. Chernykh*  
**The overexpression of *IGF-1* is a poor prognostic factor in multiple myeloma** . . . . . 42
- A.A. Solodovnik, A.S. Mkrtchyan, V.A. Misyurin, L.A. Kesaeva, N.N. Kasatkina, O.M. Votyakova, O. Yu. Yakimovich, E.G. Medvedovskaya, A.S. Antipova, I.Z. Zavodnova, O.A. Kolomeytsev, A.D. Shirin, E.A. Osmanov, A.V. Misyurin*  
**Complex cytogenetic research of cryptic chromosomal aberrations in patients with multiple myeloma** . . . . . 50
- T.M. Sokolova, V.V. Poloskov, A.N. Shuvalov, O.S. Burova, Z.A. Sokolova*  
**Signaling TLR/RLR-mechanisms of immunomodulating action of ingavirin and thymogen preparations** . . . . . 60
- E.A. Shestakova, T.A. Bogush*  
**BRCA1 participates in the expression of noncoding *XISTRNA*** . . . . . 67
- V.A. Golibrodo, I.D. Treshchalin, A.E. Shchekotikhin, E.R. Pereverzeva*  
**Neurotoxic properties of new antitumor agent anthrafuran** . . . . . 75
- O.I. Konyaeva, N. Yu. Kulbachevskaya, V.A. Chaley, N.P. Ermakova, I.B. Merkulova, T.V. Abramova, I.S. Kasatkina*  
**Equitoxicity of domestic hydroxycarbamide and reference drug hydrea in rats** . . . . . 80
- E.V. Blynskaya, S.V. Tishkov, K.V. Alekseev, S.V. Minaev*  
**Thermal cycling stage in the optimization of the freezing processes in the technology of drug lyophilized** . . . . . 87
- E.V. Ignatieva, Z.S. Shprakh, I.V. Yartseva, E.V. Sanarova*  
**Test “Dissolution” as an integral part of quality complex evaluation of capsules with sekoiolaricresinol** . . . . . 95

# СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПРОИСХОЖДЕНИИ, ОСОБЕННОСТЯХ МОРФОЛОГИИ, ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ И ПРЕДИКТИВНОЙ ЗНАЧИМОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ СОСУДОВ

М.А. Сеньчукова<sup>1,2</sup>, Е.В. Макарова<sup>1,2</sup>, Е.А. Калинин<sup>2</sup>, В.В. Ткачев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России;  
Россия, 460000 Оренбург, ул. Советская, 6;

<sup>2</sup>ГБУЗ «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер»; Россия, 460021 Оренбург, пр-т Гагарина, 11

**Контакты:** Елена Викторовна Макарова [talena2419@yandex.ru](mailto:talena2419@yandex.ru)

*В обзоре изложены современные представления о происхождении опухолевых сосудов и особенностях их морфологии. Описаны различные подходы к классификации типов сосудов, оценке их клинической и прогностической значимости. Отражены основные проблемы, связанные с использованием блокаторов ангиогенеза при лечении злокачественных новообразований, и возможные пути их решения.*

**Ключевые слова:** ангиогенез, опухолевые микрососуды, блокаторы ангиогенеза

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-6-15

## MODERN IDEAS ABOUT THE ORIGIN, FEATURES OF MORPHOLOGY, PROGNOSTIC AND PREDICTIVE SIGNIFICANCE OF TUMOR VESSELS

M.A. Senchukova<sup>1,2</sup>, E.V. Makarova<sup>1,2</sup>, E.A. Kalinin<sup>2</sup>, V.V. Tkachev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Orenburg State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation; 6 Sovetskaya St., Orenburg 460000, Russia;

<sup>2</sup>Orenburg Regional Clinical Oncology Dispensary; 11 Gagarina Prospect, Orenburg 460021, Russia

*The review presents modern ideas about the origin of tumor vessels and the features of their morphology. The various approaches to the classification of tumor vessel types and to the assessment of their clinical and prognostic significance are described. Also, the main problems associated with the use of angiogenesis blockers in the treatment of malignancies and their possible solutions are reflected in the review.*

**Key words:** tumor angiogenesis, tumor microvessels, angiogenesis blockers

Прошло более 55 лет с того момента, когда Джу-да Фолкман сформулировал свою знаменитую научную концепцию о том, что рост и метастазирование опухолей зависят от ангиогенеза и лимфангиогенеза, инициированного химическими сигналами от опухолевых клеток [1]. Многочисленные исследования подтвердили эту концепцию, и в настоящее время оценка активности ангиогенеза рассматривается как важный маркер прогноза заболевания и чувствительности к противоопухолевой терапии [2–4]. Формирование новых сосудов связано с активацией различных факторов, и среди них особая роль принадлежит фактору роста эндотелия сосудов (VEGF), который экспрессируется опухолевыми и стромальными клетками. Из 5 подтипов белков семейства

VEGF (VEGF-A, -B, -C, -D и фактор роста плаценты – PlGF) VEGF-A является ключевым белком, отвечающим за пролиферацию, выживание и мобилизацию эндотелиальных клеток-предшественников из костного мозга в периферическое кровообращение. Связываясь с мембранными тирозинкиназными рецепторами (VEGFR-1, -2 и -3), VEGF влияет на развитие новых и выживание незрелых кровеносных сосудов [5, 6]. Повышение экспрессии VEGF привлекает в строму опухоли моноциты и макрофаги, что способствует активации матриксных металлопротеиназ (ММП) и молекул клеточной адгезии [6–8], деградации межклеточного матрикса и инициации процессов инвазии, метастазирования и ангиогенеза [9, 10]. Экспрессия VEGF стимулируется

множеством проангиогенных факторов. К ним относятся эпидермальный фактор роста, основной фактор роста фибробластов, тромбоцитарный фактор роста, интерлейкин-1b, фактор роста гепатоцитов и др. [11–13]. Рядом авторов было отмечено, что уровень тканевой гипоксии имеет решающее значение в активации экспрессии VEGF, повышении плотности опухоль-ассоциированных макрофагов, плотности микрососудов в опухоли и общей активности ММП-2 и ММП-9 [8]. При недостатке кислорода клетки начинают производить индуцируемый гипоксией фактор (HIF), который запускает механизмы синтеза VEGF. Несмотря на то, что факторы транскрипции HIF-1 $\alpha$  и HIF-1 $\beta$  постоянно производятся организмом, в аэробных условиях содержание HIF-1 $\alpha$  очень низкое ввиду его крайней неустойчивости к кислороду. При гипоксии уровень HIF-1 $\alpha$  повышается, что и стимулирует синтез VEGF.

Следует отметить, что происхождение опухолевых сосудов – важный фактор, влияющий на их морфологию, участие в опухолевой прогрессии, а также на чувствительность опухоли к антиангиогенной терапии (АТ). Выделяют несколько типов формирования опухолевых сосудов, при этом в строме опухоли могут наблюдаться одновременно разные типы патологической васкуляризации [14].

**Почкование** (sprouting angiogenesis). На сегодняшний день этот тип ангиогенеза является наиболее изученным. Образование новых сосудов из уже существующих капилляров осуществляется под влиянием индукторов ангиогенеза, которые экспрессируются опухолевыми и стромальными клетками. Формирование «эндотелиальных ростков» происходит в несколько этапов и при тесном взаимодействии с компонентами экстрацеллюлярного матрикса. Под воздействием медиаторов ангиогенеза происходит дестабилизация базальной мембраны сосудов, и эндотелиальные клетки (ЭК) приобретают способность к пролиферации, миграции и инвазии. Освобождение ММП вызывает деградацию базальной мембраны и приводит к направленной миграции и пролиферации ЭК, которые дифференцируются в концевые и стеблевые клетки. Внутри прорастающих капилляров кончики клеток реагируют на VEGF и образуют характерные выпячивания (филоподии), богатые актином. В результате поляризации движущихся ЭК формируется просвет сосуда, после чего происходит его ремоделирование и созревание за счет рекрутирования перицитов и синтеза новой базальной мембраны [14–16].

Следует отметить, что форма и количество сосудов этого типа зависят от плотности и состава экстрацеллюлярного матрикса [17, 18], на формирование которого влияет проницаемость новообразованных сосудов [19]. Их аномальная проницаемость повы-

шает плотность клеток стромы, приводит к увеличению тканевой гипоксии и интерстициальной гипертензии, способствует попаданию раковых клеток в кровь и их дальнейшему распространению в отдаленные органы с образованием метастазов [20]. Современные методы АТ, нацеленные на ангиогенные факторы роста (в основном на VEGF-A и его рецепторы), направлены преимущественно на сосуды этого типа [21].

**Кооптация** – кровоснабжение за счет вовлечения находящихся поблизости сосудов [22–24]. При кооптации опухоль включает в собственное кровообращение уже существующие сосуды из окружающих тканей. Захват сосудов наиболее часто наблюдается в высокоагрессивных опухолях [23]. При этом, как было отмечено в ряде исследований, опухолевые клетки мигрируют и размножаются вдоль уже существующих сосудов на самой ранней стадии роста [25]. V.L. Bridgeman и соавт. (2017) идентифицировали 3 типа кооптации сосудов при метастазах злокачественных опухолей в легкое: альвеолярный, интерстициальный и периваскулярный. При альвеолярном и интерстициальном типах раковые клетки проникают в альвеолярное воздушное пространство или в альвеолярные стенки, кооптируя альвеолярные капилляры; при периваскулярном – растут в виде манжеты вдоль крупных сосудов [23]. Большинство исследователей отметили, что кооптированные сосуды преимущественно устойчивы к АТ [22, 23, 25–27].

**Васкулогенная мимикрия (ВМ)** – это способность наиболее агрессивных опухолевых клеток образовывать сосудистые каналы без участия ЭК или встраиваться в эндотелиальную выстилку уже существующих сосудов [14, 28]. ВМ была описана при различных злокачественных новообразованиях. Ее наличие связано с агрессивным поведением опухоли и плохим прогнозом заболевания. При ВМ злокачественные клетки подвергаются дедифференцировке и, подобно стволовым клеткам, начинают экспрессировать мультипотентные фенотипы, включая опухолевые и эндотелиальные [28–31].

Установлено, что формирование опухолевых каналов при ВМ находится под контролем каспазы-3 и не зависит от VEGFR-2-киназной активности. При ВМ наблюдается частичная эндотелий-подобная трансдифференцировка опухолевых клеток с Ca<sup>2+</sup>-зависимой перестройкой их актинового цитоскелета [32, 33]. Полагают, что сосудистая сеть, образованная опухолевыми клетками, является устойчивой к антиангиогенным лекарственным средствам (АЛС) [31, 34] и, более того, использование у этой когорты пациентов АТ может способствовать опухолевой прогрессии за счет индукции метастазов [31, 33, 35]. Изучение механизмов ВМ, в частности роли высокого уровня активных форм кислорода в опухолевых клетках, позволило предложить альтернативные

подходы к лечению пациентов со злокачественными опухолями, основанные на возможности антиоксидантов блокировать формирование опухолевых каналов при VM [36].

**Интуспективный ангиогенез.** Этот тип ангиогенеза является внутрисосудистым процессом, невидимым при стандартной световой микроскопии. Он заключается в образовании новых капилляров за счет формирования перегородки внутри их просвета [37]. Несмотря на то, что в настоящее время его роль в опухолевой прогрессии изучена недостаточно, в ряде работ было отмечено, что в процессе лучевой терапии или АТ происходит «переключение» от sprouting angiogenesis к интуспективному ангиогенезу. Авторы полагают, что описанное «переключение» может объяснять развитие резистентности опухоли к проводимой терапии и продолженный рост опухоли после прекращения лечения [38].

**Васкулогенез** — это процесс формирования кровеносных сосудов *de novo*, происходящий с участием эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) или ангиобластов. Впервые ЭПК были идентифицированы и выделены из периферической крови взрослых пациентов в 1997 г. Т. Asahara и соавт. [39]. До этого времени считалось, что васкулогенез происходит только в эмбриональном периоде. Его индукция в постнатальном периоде может быть обусловлена гипоксией тканей, связанной с их повреждением или опухолевым ростом. В физиологических условиях ЭПК покоятся, но под влиянием гипоксии, факторов роста и цитокинов выходят из костного мозга в периферическую кровь, приобретая способность циркулировать, размножаться и дифференцироваться в зрелые ЭК, участвующие в формировании новых сосудов [39]. В ряде исследований показано, что количество ЭПК в крови онкологических пациентов достоверно выше, чем у здоровых лиц [40, 41], при этом высокое содержание ЭПК связано с распространенными стадиями и неблагоприятным прогнозом заболевания [42, 43]. В ряде работ отмечено, что определение ЭПК в ткани опухоли или крови онкологических пациентов может быть полезным для оценки чувствительности опухоли к АТ [44–46] и химиотерапии [44, 47].

Изучение морфологии опухолевых сосудов выявило их значительные морфологические и архитектурные аномалии. Для опухолевых сосудов характерна структурная и функциональная неполноценность [48]. Новообразованные опухолевые сосуды расположены хаотично и беспорядочно. Диаметр сосудов варьируется, наблюдаются как резко дилатированные участки и сосуды синусоидального типа, так и сосуды, в которых просвет практически отсутствует. В строме опухоли и прилежащих тканях часто встречаются извилистые сосуды с патологическими пере-

мычками и артериовенозными шунтами. Стенки опухолевых сосудов истончены, имеют незавершенное строение, прерывистую базальную мембрану [49–52]. ЭК, выстилающие опухолевые сосуды, расположены нерегулярно, имеют неправильную форму, многочисленные цитоплазматические выросты и структурные нарушения. Клетки слабо связаны между собой, наслаиваются друг на друга, иногда выступают в просвет сосудов или располагаются периваскулярно [51, 52]. В строме некоторых злокачественных новообразований, например в глиомах зрительного нерва, описаны свободные от эндотелия каналы, находящиеся в миксоидном матриксе и имеющие прямой контакт с циркулирующей кровью. Авторы полагают, что описанные каналы могут обеспечивать примитивную васкуляризацию глиом [53].

Следует отметить, что большинство опухолевых сосудов, включая микрососуды, имеют расширенные диаметры, что, наряду с описанными выше структурными аномалиями, создает значительные сложности для классификации опухолевых сосудов на артериолы, капилляры и венулы [54]. Дефектная эндотелиальная выстилка опухолевых сосудов способствует их повышенной проницаемости, играющей важную роль в формировании опухолевой стромы и активации ангиогенеза [51, 52, 54, 55]. Полагают, что повышенная проницаемость сосудов приводит к увеличению интерстициального давления и может способствовать инвазии опухолевых клеток в лимфатические и кровеносные сосуды [56]. Этот факт важно учитывать, так как лимфоваскулярная инвазия в настоящее время рассматривается как один из наиболее важных факторов, ассоциированных с неблагоприятным прогнозом при злокачественных новообразованиях [57, 58].

При оценке прогностической значимости опухолевых сосудов следует учитывать не только особенности их происхождения, но и степень зрелости. Зрелость опухолевых сосудов определяется следующими факторами.

**1. Проллиферативная активность ЭК.** В отличие от ЭК нормальных сосудов, опухолевые ЭК обладают более высокой пролиферативной и миграционной способностью и демонстрируют более высокий уровень экспрессии VEGFR-2 [59]. В ряде исследований отмечено, что сосуды с высокой пролиферативной активностью ЭК более чувствительны к АТ, чем с низкой [60].

**2. Характер покрытия сосудов перицитами.** В настоящее время перициты признаны важными участниками ангиогенеза и потенциальными терапевтическими мишенями при различных заболеваниях. В капиллярах перициты влияют на проницаемость сосудов, их диаметр и пролиферацию ЭК, взаимодействие с которыми осуществляется как

посредством паракринной передачи сигналов, так и прямого контакта. Кроме того, они участвуют в стабилизации сосудов и влияют на выживаемость ЭК. При злокачественных новообразованиях перициты имеют выраженные структурные и функциональные нарушения. От перицитов нормальных сосудов они отличаются аномально рыхлой связью с ЭК и наличием многочисленных цитоплазматических отростков, проникающих вглубь опухолевой ткани [61]. В ряде исследований отмечена возможность их использования как маркеров ответа опухоли на химиотерапию [62].

### 3. Особенности строения базальной мембраны.

При злокачественных новообразованиях базальная мембрана новообразованных сосудов имеет выраженные структурные аномалии, включая слабую связь с ЭК и перицитами и наличие широких отростков от стенок сосудов. Базальная мембрана часто утолщена, имеет несколько слоев, что можно наблюдать при электронной микроскопии [63].

Анализ научных публикаций по изучаемому вопросу показал, что авторы используют различные подходы при изучении активности ангиогенеза в опухоли. Большинство авторов отдают предпочтение количественной оценке ангиогенеза, используя для этих целей определение плотности микрососудов, уровня экспрессии VEGF и других маркеров. Этими авторами установлено, что высокие значения данных маркеров достоверно чаще наблюдаются при распространенных стадиях болезни, наличии метастазов в регионарных лимфатических узлах, низкой степени дифференцировки опухоли и связаны с неблагоприятным прогнозом заболевания [3, 64, 65]. В то же время важно отметить, что не всем исследователям удалось подтвердить эти выводы, а в ряде случаев были получены прямо противоположные результаты [66–69]. В связи с этим альтернативным подходом к изучению особенностей опухолевого ангиогенеза является исследование качественных изменений в строении сосудистой стенки и микроциркуляторного русла опухоли. Эти исследования позволили установить, что сосуды в опухоли гетерогенны и отличаются по происхождению, морфологии, степени зрелости и чувствительности опухоли к проводимому лечению [21, 50, 55, 70].

Несмотря на то, что гетерогенность опухолевых сосудов подтверждена многочисленными исследованиями, до настоящего времени не разработана стандартная классификация сосудов, которая учитывала бы не только особенности их морфологии, но и связь с клиническими и морфологическими характеристиками патологического процесса, отдаленными результатами лечения и чувствительностью к проводимой терапии. Классификации, предложенные отдельными авторами, содержат целый ряд существенных

недостатков. Так, M.S. Gee и соавт. (2003) предложили различать опухолевые микрососуды по степени их зрелости [71]. Авторы, в зависимости от размера, проницаемости, пролиферативной активности ЭК и наличия перицитов, выделили 3 типа микрососудов. К незрелым сосудам они отнесли эндотелиальные «ростки», не имеющие просвета и отличающиеся высокой пролиферативной активностью ЭК, к промежуточным – тонкостенные капилляры, не покрытые перицитами, и к зрелым – сосуды, покрытые перицитами, с неподвижными ЭК. В эксперименте терапия интерлейкином-12 приводила к ингибированию ангиогенеза и регрессии сосудов только 1-го и 2-го типов, но увеличивала долю зрелых капилляров, покрытых перицитами [71]. Дальнейшие исследования установили, что опухолевые сосуды, резистентные к АТ, направленной против VEGF, отличаются увеличенным диаметром и охватом стенок зрелыми перицитами [72]. Для них характерна экспрессия десмина, рецептора тромбоцитарного фактора роста  $\beta$  и  $\alpha$ -гладкомышечного актина [73]. В ряде работ отмечено, что терапия, направленная на разрушение цитоскелета перицитов, устраняла резистентность опухоли к АТ и способствовала получению более полной регрессии опухоли [74].

Другая классификация микрососудов, основанная на их морфологических особенностях, была предложена J.A. Nagy и H.F. Dvorak [55]. Исследователи выделили 6 типов микрососудов, которые, по их мнению, последовательно развиваются с течением времени: материнские сосуды, гломерулоидные микрососудистые пролиферации, сосудистые мальформации, капилляры, питающие артерии и дренирующие вены [19]. Материнские сосуды представлены увеличенными синусоидами, возникающими из нормальных венул в результате деградации базальной мембраны сосудов и отслоения перицитов. ЭК в материнских сосудах расположены нерегулярно и имеют большое количество цитоплазматических отростков. Из-за дефектов в эндотелиальной выстилке и гиперэкспрессии рецепторов к VEGF (VEGFR-1 и VEGFR-2) для сосудов этого типа характерна повышенная проницаемость. Гломерулоидные микрососудистые пролиферации – это организованные сосудистые структуры, названные так из-за их микроскопического сходства с почечными клубочками. Они имеют редуцированную базальную мембрану, выстланы эндотелием и окутаны пролиферирующими перицитами. В отличие от маточных сосудов, сосудистые мальформации стабилизированы слоем нерегулярно расположенных гладкомышечных клеток [75]. На ультраструктурном уровне описанные сосуды отличались диаметром, количеством фенестр и пузырьно-вакуолярных органелл. К терапии АЛС были чувствительны только незрелые матричные

сосуды и гломерулоидные микрососудистые пролиферации [21, 70].

Ранее нами были изучены особенности ангиогенеза при раке желудка и раке молочной железы. В результате проведенного исследования были выделены 5 типов микрососудов и структур с эндотелиальной выстилкой [76, 77].

1. Обычные капилляры – сосуды диаметром 5–40 мкм, выстланные ЭК с плоскими, гиперхромными ядрами.
2. Дилатированные капилляры – крупные сосуды преимущественно округлой или овальной формы диаметром 40 мкм и более, имеющие четкие, ровные контуры. Выстилка сосудов образована ЭК с крупными светлыми ядрами с нежно-сетчатой структурой хроматина. Цитоплазма клеток равномерно накапливает маркер CD34.
3. Атипичные дилатированные капилляры – сосуды неправильной формы диаметром 40 мкм и более с нечеткими, неровными контурами. Эндотелиальная выстилка сосудов образована хаотично расположенными клетками неправильной формы, неравномерно накапливающими маркер CD34.
4. Структуры с частичной эндотелиальной выстилкой – «полостные структуры», имеющие частичную выстилку хаотично расположенными ЭК неправильной формы, также неравномерно накапливающими маркер CD34.
5. Характерные «ячеистые структуры» в рыхлой нежно-волокнистой неоформленной соединительной ткани перитуморальной области. Структуры были отнесены к сосудистым, так как часть их имела эндотелиальную выстилку, слабо экспрессирующую маркер CD34.

С прогностической точки зрения наиболее значимыми были атипичные дилатированные капилляры и структуры с частичной эндотелиальной выстилкой, которые не только имели схожие морфологические особенности эндотелиальной выстилки, высокозначимо коррелировали между собой ( $p < 0,00001$ ), но и были связаны с одними и теми же характеристиками опухолевого процесса. При раке желудка множественные атипичные дилатированные капилляры и структуры с частичной эндотелиальной выстилкой достоверно чаще наблюдались при стадиях T3–4 ( $p = 0,001$ ) и N2 ( $p = 0,001$ ) и их наличие было связано со снижением общей ( $p = 0,001$ ) и безрецидивной выживаемости ( $p = 0,0001$ ). При раке молочной железы описанные сосуды и структуры достоверно чаще наблюдались при негативном статусе рецепторов эстрогенов ( $p = 0,03$ ) и наличии опухолевых эмболов в сосудах ( $p = 0,08$ ). При раке молочной железы также отмечены корреляции количества характерных ячеистых структур с позитивным HER2/neu-статусом опухоли ( $p = 0,008$ ). Таким образом, данное ис-

следование подтвердило, что опухолевые сосуды не только гетерогенны по морфологии, но и имеют неравнозначную прогностическую значимость, что, возможно, обусловлено их различным происхождением.

Следует отметить, что в настоящее время большое число научных исследований посвящено изучению механизмов эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ). Их активация наблюдается при различных физиологических и патологических процессах, включая эмбриогенез, заживление ран, фиброз тканей и опухолевую прогрессию. Во время ЭМТ поляризованные эпителиальные клетки подвергаются множественным биологическим изменениям, что позволяет им становиться неполяризованными удлинёнными мезенхимными клетками, в которых отсутствуют межклеточные соединения и которые могут свободно перемещаться во внеклеточном матриксе. При ЭМТ в опухолевых клетках наблюдается уменьшение или полная потеря способности синтезировать цитокератины и E-кадгерин, но появляется способность синтезировать виментин, гладкомышечный актин и десмин, в результате чего они становятся подвижными. Повышенная экспрессия генов, кодирующих ММП, способствует деградации базальной мембраны и инвазии опухолевых клеток [78, 79]. При злокачественных новообразованиях ЭМТ позволяет опухолевым клеткам завершать многие этапы каскада инвазии и метастазирования, включая локальную инвазию опухолевых клеток, их проникновение в кровеносные сосуды и экстравазацию в паренхиму отдаленных тканей.

Важно подчеркнуть, что целый ряд исследований свидетельствует о том, что процессы ангиогенеза и ЭМТ тесно взаимосвязаны и могут регулироваться одними и теми же механизмами [80–82]. D. Ribatti (2017) отмечает, что при ЭМТ и ангиогенезе в клетках наблюдаются схожие процессы: потеря полярности и маркеров клеточной адгезии, реорганизация цитоскелета с приобретением мезенхимальной морфологии и способности мигрировать [82]. Экспериментально было показано, что при ЭМТ большинство раковых клеток располагаются в периваскулярном пространстве и тесно связаны с кровеносными сосудами [83]. Эти клетки экспрессируют различные маркеры перицитов, что позволяет им присоединяться к сосудистым ЭК и выполнять функции перицитов, участвуя в стабилизации сосудистого русла. Еще больший интерес вызывают сообщения о том, что ЭМТ может являться одним из основных механизмов VM [84].

Особо стоит отметить работы, направленные на определение предиктивной значимости маркеров активности ангиогенеза. Одним из наиболее признанных маркеров является уровень экспрессии VEGF [85].

Актуальность его определения обосновывается наличием АЛС, направленных на блокировку этого фактора. К таким препаратам, например, относятся гуманизированное моноклональное антитело против VEGF бевацизумаб и ингибиторы тирозинкиназы рецептора VEGF сунитиниб и сорафениб. К сожалению, клинический эффект, полученный от использования данных очень дорогостоящих препаратов, исчисляется несколькими месяцами. Более того, появляется все больше исследований, свидетельствующих о том, что, несмотря на снижение роста первичной опухоли, ингибирование VEGF может способствовать ее инвазии и метастазированию [86–89].

С точки зрения оценки предиктивной значимости опухолевых сосудов интересна работа N.R. Smith и соавт. (2013), которые в зависимости от чувствительности опухоли к ингибиторам VEGF выделили 2 типа распределения сосудов в опухоли: «опухолевый» и «стромальный» [90]. Для 1-го типа было характерно диффузное расположение сосудов между опухолевыми клетками. Этот тип был ассоциирован с потерей опухолевыми клетками E-кадгерина, экспрессией виментина и инфильтрацией опухоли макрофагами. При 2-м типе сосуды располагались преимущественно в опухолевой строме, окружавшей кластеры опухолевых клеток. Авторы показали, что наиболее чувствительны к АЛС опухоли, содержащие 60 % и больше сосудов 1-го типа. Кроме того, наиболее чувствительные к АТ опухоли (например, опухоли почек) содержат сосуды преимущественно 1-го типа, тогда как рефрактерные опухоли (например, немелкоклеточный рак легкого) – 2-го типа.

В ряде работ отмечено предиктивное значение экспрессии CD105. Так, Y. Miyata и соавт. (2015) установили, что у больных с раком предстательной железы неoadъювантная химиотерапия снижала плотность микрососудов, экспрессирующих CD105, но не влияла на плотность микрососудов, экспрессирующих CD34 и CD31 [65]. CD105 является белком-рецептором семейства TGF- $\beta$ , который участвует в независимой от VEGF регуляции ангиогенеза, и служит одним из ключевых факторов, определяющих активацию ЭК [91]. Этот маркер экспрессируется преимущественно на молодых, «растущих» сосудах. Кроме того, он присутствует на мембранах и других «подвижных» клетках (макрофагов, фибробластов, перицитов). В ряде исследований было отмечено, что CD105 может быть использован как пре-

диктивный маркер чувствительности опухоли к химиотерапии [92].

Обобщая результаты использования АЛС в клинической практике, можно отметить, что для улучшения результатов лечения злокачественных новообразований недостаточно снизить активность образования новых сосудов. Более того, данный подход, как показано выше, может способствовать опухолевой прогрессии за счет усиления тканевой гипоксии. Все это требует поиска новых подходов, направленных на нормализацию сосудов опухоли за счет воздействия на регуляторные механизмы ангиогенеза [93]. К таким подходам можно отнести снижение гипоксии в опухоли за счет использования HIF-1 $\alpha$  ингибитора пролилгидроксилазы. В эксперименте показано, что этот белок, являющийся кислородным датчиком, не влияя на плотность сосудов или размер их просвета, нормализовал эндотелиальную выстилку и созревание сосудов, что в итоге приводило к улучшению перфузии опухоли, ее оксигенации, ингибированию процессов инвазии опухолевых клеток и метастазирования [94–96], а также способствовало увеличению доставки химиопрепаратов в опухоль [88]. Другим перспективным направлением является нормализация микроциркуляции в опухоли за счет воздействия на опухолевое микроокружение. Учитывая, что воспалительная инфильтрация стромы опухоли и ЭМТ являются наиболее значимыми факторами, непосредственно связанными с ангиогенезом, инвазивным ростом и метастазированием злокачественных опухолей, такой подход может иметь хорошие перспективы, о чем свидетельствуют отдельные современные исследования [97–99].

### Заключение

Суммируя вышесказанное, можно сделать заключение о важности и перспективности дальнейших исследований клинической значимости разных типов опухолевых сосудов. Эти исследования будут способствовать стандартизации подходов к оценке активности ангиогенеза при различных злокачественных новообразованиях и улучшению прогноза заболевания. Учитывая то, что в настоящее время АТ носит чисто эмпирический характер, поиск предиктивных маркеров ответа на проводимую терапию также должен рассматриваться как приоритетная задача, решение которой невозможно без оценки роли разных типов сосудов в опухолевой прогрессии и факторов, влияющих на их формирование.

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

- Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972;175(3):409–16. PMID: 5077799.
- Han Z., Chen Z., Zheng R. et al. Clinicopathological significance of CD133 and CD44 expression in infiltrating ductal carcinoma and their relationship to angiogenesis. *World J Surg Oncol* 2015;13:56. DOI: 10.1186/s12957-015-0486-9. PMID: 25889325.
- Kraby M.R., Opdahl S., Akslen L.A., Bofin A.M. Quantifying tumour vascularity in non-luminal breast cancers. *J Clin Pathol* 2017;70(9):766–74. DOI: 10.1136/jclinpath-2016-204208. PMID: 28249942.
- Luo L.M., Xia H., Shi R. et al. The association between aquaporin-1 expression, microvessel density and the clinicopathological features of hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett* 2017;14(6):7077–84. DOI: 10.3892/ol.2017.7106. PMID: 29344137.
- Франциянц Е.М., Комарова Е.Ф., Позднякова В.В. и др. Система факторов неоангиогенеза и пролиферации в ткани меланомы кожи, ее перифокальной зоны и по линии резекции. Фундаментальные исследования 2013;7(2):423–7. [Frantsiyants E.M., Komarova E.F., Pozdnyakova V.V. et al. The system of factors of neoangiogenesis and proliferation in the tissue of the skin melanoma, its perifocal area and resection line. *Fundamentalnye issledovaniya* = *Fundamental Research* 2013;7(2):423–7. (In Russ.)].
- Yehya A.H.S., Asif M., Petersen S.H. et al. Angiogenesis: managing the culprits behind tumorigenesis and metastasis. *Medicina (Kaunas)* 2018;54(1):8. DOI: 10.3390/medicina54010008. PMID: 30344239.
- Li H., Huang N., Zhu W. et al. Modulation the crosstalk between tumor-associated macrophages and non-small cell lung cancer to inhibit tumor migration and invasion by ginsenoside Rh2. *BMC Cancer* 2018;18(1):579. DOI: 10.1186/s12885-018-4299-4. PMID: 29783929.
- Osinsky S., Bubnovskaya L., Ganusevich I. et al. Hypoxia, tumors-associated macrophages, microvessel density, VEGF and matrix metalloproteinases in human gastric cancer: interaction and impact on survival. *Clin Transl Oncol* 2011;13(2):133–8. DOI: 10.1007/s12094-011-0630-0. PMID: 21324802.
- Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С. Исследование матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов в опухолях и периферической крови онкологических больных. Клинические перспективы. *Лабораторная служба* 2013;(1):25–38. [Kushlinsky N.E., Gershteyn E.S. Study of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in tumors and peripheral blood of cancer patients. *Clinical perspectives. Laboratornaya sluzhba* = *Laboratory Service* 2013;(1):25–38. (In Russ.)].
- Wen Y.L., Li L. Correlation between matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor expression in lung adenocarcinoma. *Genet Mol Res* 2015;14(4):19342–8. DOI: 10.4238/2015.December.29.44. PMID: 26782587.
- Вартанян А.А. Основные закономерности ангиогенеза при онкогематологических заболеваниях. *Клиническая онкогематология* 2013;4(6):343–53. [Vartanyan A.A. Basic mechanisms of angiogenesis in hematological malignancies. *Klinicheskaya onkogematologiya* = *Clinical Oncohematology* 2013;4(6):343–53. (In Russ.)].
- Bodnar R.J. Anti-angiogenic drugs: involvement in cutaneous side effects and wound-healing complication. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2014;3(10):635–46. DOI: 10.1089/wound.2013.0496. PMID: 25302138.
- Piperdi B., Merla A., Perez-Soler R. Targeting angiogenesis in squamous non-small cell lung cancer. *Drugs* 2014;74(4):403–13. DOI: 10.1007/s40265-014-0182-z. PMID: 24578213.
- Zuazo-Gaztelu I., Casanovas O. Unraveling the role of angiogenesis in cancer ecosystems. *Front Oncol* 2018;8:248. DOI: 10.3389/fonc.2018.00248. PMID: 30013950.
- Hosseini F., Naghavi N. Modelling tumor-induced angiogenesis: combination of stochastic sprout spacing and sprout progression. *J Biomed Phys Eng* 2017;7(3):233–56. PMID: 29082215.
- Palm M.M., Dallinga M.G., van Dijk E. et al. Computational screening of tip and stalk cell behavior proposes a role for Apelin signaling in sprout progression. *PLoS One* 2016;11(11):e0159478. DOI: 10.1371/journal.pone.0159478. PMID: 27828952.
- Shamloo A., Mohammadali N., Heilshorn S.C., Bauer A.L. A comparative study of collagen matrix density effect on endothelial sprout formation using experimental and computational approaches. *Ann Biomed Eng* 2016;44(4):929–41. DOI: 10.1007/s10439-015-1416-2. PMID: 26271521.
- Feng X., Tonnesen M.G., Mousa S.A., Clark R.A. Fibrin and collagen differentially but synergistically regulate sprout angiogenesis of human dermal microvascular endothelial cells in 3-dimensional matrix. *Int J Cell Biol* 2013;2013:231279. DOI: 10.1155/2013/231279. PMID: 23737792.
- Dvorak H.F. Tumor stroma, tumor blood vessels, and antiangiogenesis therapy. *Cancer J* 2015;21(4):237–43. DOI: 10.1097/PPO.000000000000124. PMID: 26222073.
- Hompland T., Ellingsen C., Galappathi K., Rofstad E.K. DW-MRI in assessment of the hypoxic fraction, interstitial fluid pressure, and metastatic propensity of melanoma xenografts. *BMC Cancer* 2014;14:92. DOI: 10.1186/1471-2407-14-92. PMID: 24528854.
- Sitohy B., Chang S., Sciuto T.E. et al. Early actions of anti-vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor drugs on angiogenic blood vessels. *Am J Pathol* 2017;187(10):2337–47. DOI: 10.1016/j.ajpath.2017.06.010. PMID: 28736316.
- Frentzas S., Simoneau E., Bridgeman V.L. et al. Vessel co-option mediates resistance to anti-angiogenic therapy in liver metastases. *Nat Med* 2016;22(11):1294–302. DOI: 10.1038/nm.4197. PMID: 27748747.
- Bridgeman V.L., Vermeulen P.B., Foo S. et al. Vessel co-option is common in human lung metastases and mediates resistance to anti-angiogenic therapy in preclinical lung metastasis models. *J Pathol* 2017;241(3):362–74. DOI: 10.1002/path.4845. PMID: 27859259.
- Cai Y., Zhang J., Wu J., Li Z.Y. Oxygen transport in a three-dimensional microvascular network incorporated with early tumour growth and preexisting vessel cooption: numerical simulation study. *Biomed Res Int* 2015;2015:476964. DOI: 10.1155/2015/476964. PMID: 25695084.
- Coelho A.L., Gomes M.P., Catarino R.J. et al. Angiogenesis in NSCLC: is vessel co-option the trunk that sustains the branches? *Oncotarget*

- 2017;8(24):39795–804.  
DOI: 10.18632/oncotarget.7794.  
PMID: 26950275.
26. Kuczynski E.A., Kerbel R.S. Implications of vessel co-option in sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma. *Chin J Cancer* 2016;35(1):97. DOI: 10.1186/s40880-016-0162-7. PMID: 27887628.
  27. Qian C.N. Hijacking the vasculature in ccRCC – co-option, remodelling and angiogenesis. *Nat Rev Urol* 2013;10(5):300–4. DOI: 10.1038/nrurol.2013.26. PMID: 23459032.
  28. Maniotis A.J., Folberg R., Hess A. et al. Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999;155(3):739–52. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65173-5. PMID: 10487832.
  29. Vartanian A.A. Signaling pathways in tumor vasculogenic mimicry. *Biochemistry (Mosc)* 2012;77(9):1044–55. DOI: 10.1134/S000629791209012X. PMID: 23157265.
  30. Ge H., Luo H. Overview of advances in vasculogenic mimicry – a potential target for tumor therapy. *Cancer Manag Res* 2018;10:2429–37. DOI: 10.2147/CMAR.S164675. PMID: 30122992.
  31. Angara K., Rashid M.H., Shankar A. et al. Vascular mimicry in glioblastoma following anti-angiogenic and anti-VEGF therapies. *Histol Histopathol* 2017;32(9):917–28. DOI: 10.14670/HH-11-856. PMID: 27990624.
  32. Vartanian A., Stepanova E., Grigorieva I. et al. Melanoma vasculogenic mimicry capillary-like structure formation depends on integrin and calcium signaling. *Microcirculation* 2011;18(5):390–9. DOI: 10.1111/j.1549-8719.2011.00102.x. PMID: 21438962.
  33. Вартанян А.А. Альтернативное кровоснабжение в костном мозге при онкогематологических заболеваниях. *Клиническая онкогематология* 2014;7(4):491–500. [Vartanian A.A. Supplemental blood circulation system in hematologic malignancies. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2014;7(4):491–500. (In Russ.)].
  34. Soda Y., Myskiw C., Rommel A., Verma I.M. Mechanisms of neovascularization and resistance to anti-angiogenic therapies in glioblastoma multiforme. *J Mol Med (Berl)* 2013;91(4):439–48. DOI: 10.1007/s00109-013-1019-z. PMID: 23512266.
  35. Perez-Ribes M., Allen E., Hudock J. et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 2009;15(3):220–31. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.01.027. PMID: 19249680.
  36. Vartanian A.A., Burova O.S., Stepanova E.V. et al. Melanoma vasculogenic mimicry is strongly related to reactive oxygen species level. *Melanoma Res* 2007;17(6):370–9. DOI: 10.1097/CMR.0b013e3282f1d2ec. PMID: 17992120.
  37. Burri P.H., Hlushchuk R., Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn* 2004;231(3):474–88. DOI: 10.1002/dvdy.20184. PMID: 15376313.
  38. Hlushchuk R., Riesterer O., Baum O. et al. Tumor recovery by angiogenic switch from sprouting to intussusceptive angiogenesis after treatment with PTK787/ZK222584 or ionizing radiation. *Am J Pathol* 2008;173(4):1173–85. DOI: 10.2353/ajpath.2008.071131. PMID: 18787105.
  39. Asahara T., Murohara T., Sullivan A. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275(5302):964–7. PMID: 9020076.
  40. Moschetta M., Mishima Y., Sahin I. et al. Role of endothelial progenitor cells in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 2014;1846(1):26–39. DOI: 10.1016/j.bbcan.2014.03.005. PMID: 24709008.
  41. Paprocka M., Kieda C., Kantor A. et al. Increased endothelial progenitor cell number in early stage of endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2017;27(5):947–52. DOI: 10.1097/IGC.0000000000000961. PMID: 28498245.
  42. Yu M., Men H.T., Niu Z.M. et al. Meta-analysis of circulating endothelial cells and circulating endothelial progenitor cells as prognostic factors in lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16(14):6123–8. PMID: 26320506.
  43. Ziebart T., Blatt S., Günther C. et al. Significance of endothelial progenitor cells (EPC) for tumorigenesis of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): possible marker of tumor progression and neovascularization? *Clin Oral Investig* 2016;20(8):2293–300. DOI: 10.1007/s00784-016-1785-4. PMID: 26993659.
  44. Tanaka S., Ueno T., Ishiguro H. et al. The lack of increases in circulating endothelial progenitor cell as a negative predictor for pathological response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *NPJ Precis Oncol* 2017;1(1):6. DOI: 10.1038/s41698-017-0006-1. PMID: 29872695.
  45. Sudo K., Sato K., Sakamoto S. et al. Association between endothelial progenitor cells and treatment response in non-squamous non-small cell lung cancer treated with bevacizumab. *Anticancer Res* 2017;37(10):5565–71. DOI: 10.21873/anticancer.11989. PMID: 28982871.
  46. Naito H., Wakabayashi T., Kidoya H. et al. Endothelial side population cells contribute to tumor angiogenesis and antiangiogenic drug resistance. *Cancer Res* 2016;76(11):3200–10. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2998. PMID: 27197162.
  47. Morita R., Sato K., Nakano M. et al. Endothelial progenitor cells are associated with response to chemotherapy in human non-small-cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137(12):1849–57. DOI: 10.1007/s00432-011-1043-8. PMID: 21927909.
  48. Fabian K.L., Storkus W.J. Immunotherapeutic targeting of tumor-associated blood vessels. *Adv Exp Med Biol* 2017;1036:191–211. DOI: 10.1007/978-3-319-67577-0\_13. PMID: 29275473.
  49. Fisher D.T., Muhitch J.B., Kim M. et al. Intraoperative intravital microscopy permits the study of human tumour vessels. *Nat Commun* 2016;7:10684. DOI: 10.1038/ncomms10684. PMID: 26883450.
  50. Birau A., Ceausu R.A., Cimpean A.M. et al. Assessment of angiogenesis reveals blood vessel heterogeneity in lung carcinoma. *Oncol Lett* 2012;4(6):1183–6. DOI: 10.3892/ol.2012.893. PMID: 23205116.
  51. Klein D. The tumor vascular endothelium as decision maker in cancer therapy. *Front Oncol* 2018;8:367. DOI: 10.3389/fonc.2018.00367. PMID: 30250827.
  52. Hashizume H., Baluk P., Morikawa S. et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 2000;156(4):1363–80. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65006-7. PMID: 10751361.
  53. Snuderl M., Zhang G., Wu P. et al. Endothelium-independent primitive myxoid vascularization creates invertebrate-like channels to maintain blood supply in optic gliomas. *Am J Pathol* 2017;187(8):1867–78. DOI: 10.1016/j.ajpath.2017.04.004. PMID: 28606795.
  54. Stamatelos S.K., Kim E., Pathak A.P., Popel A.S. A bioimage informatics based reconstruction of breast tumor

- microvasculature with computational blood flow predictions. *Microvasc Res* 2014;91:8–21. DOI: 10.1016/j.mvr.2013.12.003. PMID: 24342178.
55. Nagy J.A., Dvorak H.F. Heterogeneity of the tumor vasculature: the need for new tumor blood vessel type-specific targets. *Clin Exp Metastasis* 2012;29(7):657–62. DOI: 10.1007/s10585-012-9500-6. PMID: 22692562.
56. Rofstad E.K., Galappathi K., Mathiesen B.S. Tumor interstitial fluid pressure – a link between tumor hypoxia, microvascular density, and lymph node metastasis. *Neoplasia* 2014;16(7):586–94. DOI: 10.1016/j.neo.2014.07.003. PMID: 25117980.
57. Al-Sukhni E., Attwood K., Gabriel E.M. et al. Lymphovascular and perineural invasion are associated with poor prognostic features and outcomes in colorectal cancer: a retrospective cohort study. *Int J Surg* 2017;37:42–9. DOI: 10.1016/j.ijss.2016.08.528. PMID: 27600906.
58. Wang A., Tan Y., Geng X. et al. Lymphovascular invasion as a poor prognostic indicator in thoracic esophageal carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Dis Esophagus* 2019;32(2). DOI: 10.1093/dote/doy083. PMID: 30169614.
59. Maishi N., Ohba Y., Akiyama K. et al. Tumour endothelial cells in high metastatic tumours promote metastasis via epigenetic dysregulation of biglycan. *Sci Rep* 2016;6:28039. DOI: 10.1038/srep28039. PMID: 27295191.
60. Bujor I.S., Cioca A., Ceausu R.A. et al. Evaluation of vascular proliferation in molecular subtypes of breast cancer. *In Vivo* 2018;32(1):79–83. DOI: 10.21873/invivo.11207. PMID: 29275302.
61. Kelly-Goss M.R., Sweat R.S., Stapor P.C. et al. Targeting pericytes for angiogenic therapies. *Microcirculation* 2014;21(4):345–57. DOI: 10.1111/micc.12107. PMID: 24267154.
62. Kim J., de Sampaio P.C., Lundy D.M. et al. Heterogeneous perivascular cell coverage affects breast cancer metastasis and response to chemotherapy. *JCI Insight* 2016;1(21):e90733. DOI: 10.1172/jci.insight.90733. PMID: 28018977.
63. Baluk P., Morikawa S., Haskell A. et al. Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* 2003;163(5):1801–15. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63540-7. PMID: 14578181.
64. Sun C., Li J., Wang B. et al. Tumor angiogenesis and bone metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *J Immunol Methods* 2018;452:46–52. DOI: 10.1016/j.jim.2017.10.006. PMID: 29066178.
65. Miyata Y., Mitsunari K., Asai A. et al. Pathological significance and prognostic role of microvessel density, evaluated using CD31, CD34, and CD105 in prostate cancer patients after radical prostatectomy with neoadjuvant therapy. *Prostate* 2015;75(1):84–91. DOI: 10.1002/pros.22894. PMID: 25307287.
66. Hakala T., Sand J., Kellokumpu-Lehtinen P.L. et al. Recurrent thyroid cancers have more peritumoural lymphatic vasculature than nonrecurrent thyroid cancers. *Eur J Clin Invest* 2014;44(9):825–32. DOI: 10.1111/eci.12301. PMID: 25047155.
67. Liu H., Jiang Y., Dai Q. et al. Peripheral enhancement of breast cancers on contrast-enhanced ultrasound: correlation with microvessel density and vascular endothelial growth factor expression. *Ultrasound Med Biol* 2014;40(2):293–9. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2013.10.004. PMID: 24315392.
68. Rudno-Rudzińska J., Donizy P., Frejlich E. et al. Lymphangiogenesis in early and advanced gastric cancer: is there any difference? *J Gastroenterol Hepatol* 2014;29 Suppl 4:107–11. DOI: 10.1111/jgh.12733. PMID: 25521742.
69. Minajeva A., Kase M., Saretok M. et al. Impact of blood vessel quantity and vascular expression of CD133 and ICAM-1 on survival of glioblastoma patients. *Neurosci J* 2017;2017:5629563. DOI: 10.1155/2017/5629563. PMID: 29250531.
70. Sitohy B., Nagy J.A., Jaminet S.C., Dvorak H.F. Tumor-surrogate blood vessel subtypes exhibit differential susceptibility to anti-VEGF therapy. *Cancer Res* 2011;71(22):7021–8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1693. PMID: 21937680.
71. Gee M.S., Procopio W.N., Makonnen S. et al. Tumor vessel development and maturation impose limits on the effectiveness of anti-vascular therapy. *Am J Pathol* 2003;162(1):183–93. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63809-6. PMID: 12507901.
72. Cascone T., Herynk M.H., Xu L. et al. Upregulated stromal EGFR and vascular remodeling in mouse xenograft models of angiogenesis inhibitor-resistant human lung adenocarcinoma. *J Clin Invest* 2011;121(4):1313–28. DOI: 10.1172/JCI42405. PMID: 21436589.
73. Helfrich I., Scheffrahn I., Bartling S. et al. Resistance to antiangiogenic therapy is directed by vascular phenotype, vessel stabilization, and maturation in malignant melanoma. *J Exp Med* 2010;207(3):491–503. DOI: 10.1084/jem.20091846. PMID: 20194633.
74. Chen M., Lei X., Shi C. et al. Pericyte-targeting prodrug overcomes tumor resistance to vascular disrupting agents. *J Clin Invest* 2017;127(10):3689–701. DOI: 10.1172/JCI94258. PMID: 28846068.
75. Nagy J.A., Feng D., Vasile E. et al. Permeability properties of tumor surrogate blood vessels induced by VEGF-A. *Lab Invest* 2006;86(8):767–80. DOI: 10.1038/labinvest.3700436. PMID: 16732297.
76. Senchukova M., Kiselevsky M.V. The “cavitary” type of angiogenesis by gastric cancer. Morphological characteristics and prognostic value. *J Cancer* 2014;5(5):311–9. DOI: 10.7150/jca.8716. PMID: 24723973.
77. Senchukova M.A., Nikitenko N.V., Tomchuk O.N. et al. Different types of tumor vessels in breast cancer: morphology and clinical value. *Springerplus* 2015;4:512. DOI: 10.1186/s40064-015-1293-z. PMID: 26405632.
78. Nantajit D., Lin D., Li J.J. The network of epithelial-mesenchymal transition: potential new targets for tumor resistance. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015;141(10):1697–713. DOI: 10.1007/s00432-014-1840-y. PMID: 25270087.
79. Мнихович М.В., Вернигородский С.В., Буньков К.В. Эпителиально-мезенхимальный переход. Трансдифференциация. Репрограммирование и метоплазия. Современный взгляд на проблему. Морфологические ведомости 2017;(3):4–21. [Mnikhovich M.V., Vernigorodsky S.V., Bun'kov K.V. Epithelial-mesenchymal transition. Transdifferentiation. Reprogramming and metaplasia. Modern view of the problem. *Morfologicheskie vedomosti = Morphological Newsletter* 2017;(3):4–21. (In Russ.)].
80. Fantozzi A., Gruber D.C., Pisarsky L. et al. VEGF-mediated angiogenesis links EMT-induced cancer stemness to tumor initiation. *Cancer Res* 2014;74(5):1566–75. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1641. PMID: 24413534.
81. Li C., Li Q., Cai Y. et al. Overexpression of angiopoietin 2 promotes the formation of oral squamous cell carcinoma by increasing epithelial-mesenchymal transition-induced angiogenesis. *Cancer Gene Ther* 2016;23(9):295–302.

- DOI: 10.1038/cgt.2016.30.  
PMID: 27492854.
82. Ribatti D. Epithelial-mesenchymal transition in morphogenesis, cancer progression and angiogenesis. *Exp Cell Res* 2017;353(1):1–5.  
DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.02.041.  
PMID: 28257786.
83. Shenoy A.K., Jin Y., Luo H. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition confers pericyte properties on cancer cells. *J Clin Invest* 2016;126(11):4174–86.  
DOI: 10.1172/JCI86623.  
PMID: 27721239.
84. Liu Q., Qiao L., Liang N. et al. The relationship between vasculogenic mimicry and epithelial-mesenchymal transitions. *J Cell Mol Med* 2016;20(9):1761–9. DOI: 10.1111/jcmm.12851. PMID: 27027258.
85. Bruhn M.A., Townsend A.R., Khoon Lee C. et al. Proangiogenic tumor proteins as potential predictive or prognostic biomarkers for bevacizumab therapy in metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer* 2014;135(3):731–41.  
DOI: 10.1002/ijc.28698.  
PMID: 24374727.
86. Ueda S., Saeki T., Osaki A. et al. Bevacizumab induces acute hypoxia and cancer progression in patients with refractory breast cancer: multimodal functional imaging and multiplex cytokine analysis. *Clin Cancer Res* 2017;23(19):5769–78.  
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0874.  
PMID: 28679773.
87. von Baumgarten L., Brucker D., Tirmiceru A. et al. Bevacizumab has differential and dose-dependent effects on glioma blood vessels and tumor cells. *Clin Cancer Res* 2011;17(19):6192–205.  
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1868.  
PMID: 21788357.
88. Leite de Oliveira R., Deschoemaeker S., Henze A.T. et al. Gene-targeting of Phd2 improves tumor response to chemotherapy and prevents side-toxicity. *Cancer Cell* 2012;22(2):263–77.  
DOI: 10.1016/j.ccr.2012.06.028.  
PMID: 22897855.
89. Miyazaki S., Kikuchi H., Iino I. et al. Anti-VEGF antibody therapy induces tumor hypoxia and stanniocalcin 2 expression and potentiates growth of human colon cancer xenografts. *Int J Cancer* 2014;135(2):295–307.  
DOI: 10.1002/ijc.28686.  
PMID: 24375080.
90. Smith N.R., Baker D., Farren M. et al. Tumor stromal architecture can define the intrinsic tumor response to VEGF-targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2013;19(24):6943–56.  
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1637.  
PMID: 24030704.
91. Смирнов И.В., Грязева И.В., Самойлович М.П., Климович В.Е. Эндоглин (CD105) – мишень для визуализации и антиангиогенной терапии злокачественных опухолей. *Вопросы онкологии* 2015;61(6):898–907. [Smirnov I.V., Gryazeva I.V., Samoylovich M.P., Klimovich V.E. Endoglin (CD105) – target for imaging and antiangiogenic therapy of malignant tumors. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology* 2015;61(6):898–907. (In Russ.)].
92. Штабинская Т.Т., Боднар М., Ляликов С.А. и др. Значение уровня позитивности CD105 в раке толстой кишки для прогноза эффективности химиотерапии. *Евразийский онкологический журнал* 2015;7(4):35–42. [Shtabinskaya T.T., Bodnar M., Lyalikov S.A. et al. The level of CD105 positivity in colon cancer to predict chemotherapy effectiveness. *Evrziasysky onkologichesky zhurnal = Eurasian Journal of Oncology* 2015;7(4):35–42. (In Russ.)].
93. Viillard C., Larrivée B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis* 2017;20(4):409–26.  
DOI: 10.1007/s10456-017-9562-9.  
PMID: 28660302.
94. Chen J.X., Stinnett A. Ang-1 gene therapy inhibits hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha)-prolyl-4-hydroxylase-2, stabilizes HIF-1alpha expression, and normalizes immature vasculature in db/db mice. *Diabetes* 2008;57(12):3335–43. DOI: 10.2337/db08-0503. PMID: 18835934.
95. Mazzone M., Dettori D., de Oliveira R.L. et al. Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. *Cell* 2009;136(5):839–51.  
DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.020.  
PMID: 19217150.
96. Kuchnio A., Moens S., Bruning U. et al. The cancer cell oxygen sensor PHD2 promotes metastasis via activation of cancer-associated fibroblasts. *Cell Rep* 2015;12(6):992–1005.  
DOI: 10.1016/j.celrep.2015.07.010.  
PMID: 26235614.
97. Gkretsi V., Zacharia L.C., Stylianopoulos T. Targeting inflammation to improve tumor drug delivery. *Trends Cancer* 2017;3(9):621–30. DOI: 10.1016/j.trecan.2017.07.006. PMID: 28867166.
98. Li W., Li X., Liu S. et al. Gold nanoparticles attenuate metastasis by tumor vasculature normalization and epithelial-mesenchymal transition inhibition. *Int J Nanomedicine* 2017;12:3509–20. DOI: 10.2147/IJN.S128802. PMID: 28496326.
99. Wang B., Ding Y., Zhao X. et al. Delivery of small interfering RNA against Nogo-B receptor via tumor-acidity responsive nanoparticles for tumor vessel normalization and metastasis suppression. *Biomaterials* 2018;175:110–22.  
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.05.034.  
PMID: 29803999.

#### Вклад авторов

М.А. Сеньчукова: разработка концепции статьи, редактирование статьи, утверждение окончательного варианта;  
Е.В. Макарова: анализ данных литературы, написание раздела обзора, редактирование статьи;  
Е.А. Калинин: анализ данных литературы, написание раздела обзора;  
В.В. Ткачев: анализ данных литературы, написание раздела обзора.

#### Authors' contributions

M.A. Senchukova: development of the article concept, editing of the article, approval of the final version;  
E.V. Makarova: analysis of literature data, writing of the review section, editing of the article;  
E.A. Kalinin: analysis of literature data, writing of the review section;  
V.V. Tkachev: analysis of literature data, writing of the review section.

#### ORCID авторов/ORCID of authors

М.А. Сеньчукова/ M.A. Senchukova: <https://orcid.org/0000-0001-8371-740X>  
Е.В. Макарова/ E.V. Makarova: <https://orcid.org/0000-0002-5796-3719>

#### Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и субъекта РФ в рамках научного проекта № 18-415-560005.  
**Financing.** The study was carried out with the financial support of the RFBR and the RF Subject in the framework of the scientific project No. 18-415-560005.

## ВАСКУЛОГЕННАЯ МИМИКРИЯ ПРИ МЕЛАНОМЕ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Д.Л. Ротин<sup>1</sup>, К.С. Титов<sup>2</sup>, А.М. Казаков<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Государственная Израильская больница «ШИБА» (Тель ха-Шомер); Израиль, 52621 Рамат-Ган, Дорога ШИБА, 2;

<sup>2</sup>ГБУЗ «Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова» Департамента здравоохранения г. Москвы; Россия, 111123 Москва, ш. Энтузиастов, 86;

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

**Контакты:** Алексей Михайлович Казаков [hordavii@yandex.ru](mailto:hordavii@yandex.ru)

Концепция васкулогенной мимикрии (ВМ) была введена для описания уникальной способности высокоагрессивных опухолевых клеток формировать капиллярно-подобные структуры и богатую матрицами структурированную сеть в трехмерной культуре, которая имитирует эмбриональную васкулогенную сеть. Сообщалось о ВМ в нескольких агрессивных опухолях, включая рак яичников, молочной железы, печени, легких, саркому, глиобластому. Следует отметить, что ВМ в меланоцитарных опухолях наиболее распространена и является наиболее изученной. Хотя большое внимание уделялось факторам, которые стимулируют или подавляют образование сосудистых каналов опухолевыми клетками, молекулярные механизмы, лежащие в основе этого явления, остаются загадочными. Этот обзор будет посвящен молекулярным детерминантам и ключевым сигнальным путям, участвующим в опухолевой ВМ. Исследование лекарственных препаратов, нацеленных на молекулярные сигнальные пути в ВМ, является областью проблем и надежд. Исследования на ВМ увеличат наши знания о молекулярных событиях, дающих агрессивным опухолевым клеткам пластичность, что приводит к их способности имитировать сосудистую систему. На сегодняшний день существует мало функциональных данных, которые показывают, как каналы, связанные с опухолевыми клетками, способствуют общей выживаемости опухоли. Однако даже среди исследователей, которые поставили под сомнение концепцию ВМ как важнейшей системы кровообращения, в целом существует консенсус о том, что прогностическое значение PAS-положительных паттернов важно.

**Ключевые слова:** васкулогенная мимикрия, меланома, прогностическая роль

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-16-24

### VASCULOGENIC MIMICRY IN MELANOMA: MOLECULAR MECHANISMS AND CLINICAL SIGNIFICANCE

D. L. Rotin<sup>1</sup>, K. S. Titov<sup>2</sup>, A. M. Kazakov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Sheba State Hospital of Israel (Tel HaShomer); 2 Derech Sheba, Ramat Gan 52621, Israel;

<sup>2</sup>A.S. Loginov Moscow Clinical and Scientific Center, Moscow Healthcare Department;

86 Shosse Entuziastov, Moscow 111123, Russia;

<sup>3</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation; 24 Kashyrskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

The concept of vasculogenic mimicry (VM) was introduced to describe the unique ability of highly aggressive tumor cells to form capillary-like structures and matrix-rich patterned network in three-dimensional culture that mimic embryonic vasculogenic network. VM has been reported in several aggressive tumors including ovaries, breast, liver, lung cancer, sarcoma, glioblastoma. It is worth to note, that VM in melanocyte-originated tumors is the most studied. Although much attention has been focused on factors that stimulate or suppress vascular channel formation by tumor cells, the molecular mechanisms underlying this phenomenon remain enigmatic. This review will focus on molecular determinants and key signaling pathways involved in tumor VM. The exploration of drugs targeted at molecular signaling pathways in VM is a field of challenges and hopes. The research on VM will increase our knowledge of the molecular events causing aggressive tumor cells to gain plasticity resulting in their ability to mimic vasculature. To date, little functional data exist that show how tumor cell-lined channels contribute to the overall survival of the tumor. However, even among researches who have questioned the concept of VM as a crucial circulatory system, there is generally a consensus that the prognostic significance of PAS-positive patterns is valid.

**Key words:** vasculogenic mimicry, melanoma, prognostic

### Васкулогенная мимикрия и другие типы альтернативного неоангиогенеза

Феномен васкулогенной мимикрии (ВМ) заключается в формировании капиллярно-подобных структур в некоторых опухолях, в том числе в меланоме, и является одним из факторов, делающих опухоль более агрессивной [1–3]. Ангиогенез (от греч. «ангио» – сосуд, «генезис» – рождение) – физиологический процесс формирования новых сосудов на основе эндотелиальных клеток посткапиллярных венул. Васкулогенез – процесс формирования *in situ* новых микрососудов из ангиобластов, клеток-предшественниц эндотелиальных клеток. Образование сосудов путем ангиогенеза – важный жизненный компонент многих физиологических и некоторых патологических процессов [4]. Неоваскуляризация необходима для роста, выживания и метастазирования злокачественных солидных опухолей. Работы по изучению опухолевого ангиогенеза посвящены преимущественно злокачественным новообразованиям, хотя имеются отдельные исследования и в доброкачественных опухолях [5]. Следует понимать, что некоторые из этих «доброкачественных» вариантов могут представлять собой «предзлокачественные» процессы, например аденоматозный колоректальный полип. Для роста доброкачественных пролиферативных процессов также требуется наличие новообразованных сосудов. Долгие годы существовало мнение, что единственным механизмом неоваскуляризации является развитие сосудов из прорастающих эндотелиоцитов. Данный процесс служит главным ангиогенным механизмом при нормальном росте и развитии, а также при заживлении ран и ожогов. На сегодняшний день выявлено 5 моделей опухолевого неоангиогенеза:

- 1) прямое прорастание эндотелия;
- 2) «сосудистая непроходимость» (сосудистое расщепление);
- 3) вариант с предсуществующей васкуляризацией;
- 4) постнатальный васкулогенез из предшественников эндотелиоцитов;
- 5) ВМ [6].

Для удобства термин «ангиогенез» используется для обозначения всех вышеперечисленных типов образования кровеносных сосудов в опухоли. Тем не менее минимум 2 из этих 5 типов в действительности представляют собой васкулогенез.

### Васкулогенная мимикрия. Определение

ВМ – формирование васкулярных каналов *de novo*, осуществляется высокоагрессивными или метастатическими опухолевыми клетками. Строго говоря, ВМ не считается «васкулогенным процессом», ведущим к формированию *de novo* кровеносных сосудов, высланных эндотелием. Впервые данный феномен

был описан в 1999 г. А. J. Maniotis и соавт. Этими же авторами был предложен и термин «ВМ» для сформированных *de novo* сосудистых структур, отличных от истинного васкулогенеза [7]. При ВМ на гистологических срезах первичной и метастатической увеальной меланомы человека наблюдались солидные и полые ШИК (ШИК-реакция, выявление в тканях гликопротеидов, мукополисахаридов, гликолипидов) – позитивные элементы микроваскулярной (микроциркуляторной) сети, соединенные между собой петлями внеклеточного матрикса [7]. Отмечено, что до 45 % кровоснабжения увеальных меланом осуществляется через каналы ВМ. С использованием световой, электронной микроскопии и иммуногистохимии (меланоцитарные и эндотелиальные маркеры) обнаружено, что похожие на капилляры структуры (сети ВМ) состоят из внеклеточного матрикса, а снаружи высланы клетками меланомы. В то же время эндотелиальные клетки отсутствуют в сети ВМ, хотя в просветах полостей обнаруживаются эритроциты. Внутренний слой микроваскулярных структур, высланных снаружи клетками меланомы, состоит из белков внеклеточного матрикса, как то: ламинин, коллаген IV и VI типов, протеогликан гепарин-сульфат. Клетки агрессивной увеальной и кожной меланомы способны воспроизвести солидные и полые матриксные каналы *in vitro* при отсутствии эндотелиальных клеток, фибробластов или растворимых факторов роста в 3-мерных культурах, содержащих Matrigel или растворимый коллаген I типа [7–10].

«Золотым стандартом» для характеристики и изучения клеток ВМ стала гистохимическая окраска ШИК, а также отсутствие экспрессии CD31 и CD34 по данным иммуногистохимии. CD31 – молекула адгезии эндотелиоцитов и тромбоцитов (PECAM1). Каналы ВМ позитивны по окраске ШИК, но негативны для CD31 (и CD34). Сеть ВМ определяется примерно в 34 % случаев первичных увеальной и кожной меланом [7, 11]. Можно выделить 4 главных характеристики сети при ВМ:

- 1) сосудистая сеть, высланная опухолевыми клетками;
- 2) экспрессия примитивного фенотипа опухолевых клеток с преобладанием маркеров эндотелиальных и стволовых клеток;
- 3) функциональная связь ВМ-сети с сосудами, высланными эндотелием;
- 4) существование противотромботических агентов, которые содействуют кровотоку сквозь данную сеть, делая ее функциональной и важной для снабжения опухоли кислородом и другими питательными веществами.

На сегодняшний день ВМ обнаружена и изучена в целом ряде различных злокачественных опухолей, но меланома (увеальная и кожная) – преобладающий

тип опухоли в большинстве работ. В связи с этим мы приводим обзор исследований VM в меланоме и доброкачественных меланоцитарных опухолях.

#### Функциональная важность васкулогенной мимикрии

Ведутся дискуссии о том, является ли сеть при VM функционирующей или представляет собой артефакт из опухолевых клеток, помещенных рядом с кровеносными сосудами, или же это вообще процесс замещения эндотелиоцитов опухолевыми клетками, инвазирующими кровеносные сосуды.

В колоректальном раке обнаружены мозаичные сосуды, выстланные 2 типами клеток – эндотелием и опухолевыми. Предполагают, что опухолевые клетки выстилают просвет, наползая и замещая эндотелий, либо эндотелиальные клетки просто теряют способность к экспрессии CD31 [12, 13]. Концепция мозаичных сосудов не противоречит существованию VM. Наличие 2 типов сосудов – выстланных эндотелиальными и опухолевыми клетками, возможно, представляет 2 крайности, между которыми данные типы клеток присутствуют в сосудистой выстилке в различных процентных соотношениях. Вероятно, VM преобладает в ранней фазе опухоли, сосуды с эндотелием – в период, когда опухоль быстро увеличивается в размерах, а мозаичные сосуды – на промежуточной стадии опухолевого роста. На самой ранней стадии роста опухоли ( $\leq 2$  мм) васкуляризация не нужна, а питательные вещества и кислород проникают в нее из окружающей нормальной ткани путем простой диффузии [14].

Показана возможность переноса жидкости в культурах агрессивной увеальной меланомы *in vivo* [7, 15] и в мышинной модели человеческой меланомы кожи [9, 16] сетью VM. Также показано, что VM у пациентов с увеальной меланомой способна к переносу и циркуляции индоцианового зеленого *in vivo* [10, 17]. Это доказывает, что VM-сеть является функциональной, представляя собой альтернативный путь для питания опухоли. Допплеровское ультразвуковое исследование *in vivo* на мышинной модели человеческой меланомы кожи показывает функциональную связь и перфузию крови между мышинными сосудами с эндотелием и участками VM в меланоме человека [18].

#### Модели исследования васкулогенной мимикрии

Феномен VM был впервые обнаружен M.J. Hendrix и соавт., которые внесли большой вклад в изучение сигнальных путей, контролирующих этот процесс. Множество исследований VM проведено *in vitro*. В *in vitro* моделях VM часто используется культивирование клеток в 3D-культуре на коллагене I типа (в качестве субстрата) [19]. Реже применяется трехмерный гель Matrigel [7]. Самыми частыми клеточными линиями для изучения VM являются челове-

ческие линии меланомы кожи C8161 (агрессивная) и C81–61 (низкоагрессивная) и человеческие линии увеальной меланомы MUM-2B, C918 (обе агрессивные) и MUM-2C (низкоагрессивная). Также применяются экспериментальные модели – для исследования VM у иммунодефицитных мышей NOD/SCID, иммунокомпетентных мышей C57BL/6 и мышей-альбиносов BALB/c. На этих животных используют обычно алло- и ксенотрансплантаты. Для модели с аллотрансплантатом используют клетки мышинной меланомы B16F10, а для моделей с ксенотрансплантатом – вышеперечисленные клеточные линии меланомы человека [3, 7, 10, 15].

#### Характеристика клеток васкулогенной мимикрии меланомы

Существуют 2 главные теории онтогенеза сети при VM. Первая теория утверждает, что каналы выстланы опухолевыми клетками, подвергшимися дедифференцировке, т.е. клетками примитивного типа, с характеристиками разных типов клеток (эндотелий, опухолевые, стволовые и т.п.). Вторая теория говорит, что формирование сети VM происходит из стволовых опухолевых клеток [20–22].

Клетки каналов VM при меланоме напоминают недифференцированные примитивные стволовые клетки эмбрионального типа со схожей экспрессией генов и молекулярными механизмами [20]. Характерной чертой в этом случае является экспрессия генов множества клеточных линий (эндотелиальные, эпителиальные и гемопоэтические клетки, а также нейроны и миоциты) [23]. Более того, они экспрессируют некоторые гены эмбриональных стволовых клеток, например NODAL [24, 25]. Клетки меланомы с экспрессией АТФ-связывающего белка ABCB5 предположительно являются «стволовыми клетками меланомы» или «злокачественными иницирующими меланому клетками», они также склонны к формированию VM [26, 27]. Суперсемейство ABC состоит из активных мембранных транспортеров, экспрессирующихся на стволовых/примитивных клетках. С ними связана мультилекарственная резистентность. CD133 (human prominin 1), трансмембранный гликопротеин, обнаружен в стволовых клетках вместе с ABCB5 и васкулярным эндотелиальным кадхерином (синонимы: кадхерин-5, CD144) [28]. Клетки увеальной меланомы, способные к формированию каналов VM, экспрессируют другой маркер стволовых клеток – CD271 (синонимы: фактор роста нервов (NGFR), p75NTR). Клетки увеальной меланомы, не участвующие в формировании VM-каналов, не экспрессируют CD271 [29].

Молекулярный анализ более 30 клеточных линий человеческих меланом кожи выявил, что ряд генов, включенных в ангиогенез/васкулогенез, кодирующих

VE-кадгерин, тирозинкиназу с доменами 1 EGFR и фибронектин-1, и множество эпителий-ассоциированных генов, например рецептор 2 эфрина тип А (EphA2), экспрессируются в клетках агрессивных меланом при сравнении с менее агрессивными клетками [23]. Более того, обнаружено, что гены, связанные с ангиогенезом, EphA и VEGF, имеют уровень экспрессии выше в очагах сети ВМ по сравнению с другими участками культур клеток агрессивной кожной и увеальной меланомы [30].

#### Молекулярные изменения в васкулогенной мимикрии меланомы и экспериментальные попытки ее ингибирования

**EphA2/VE-кадгерин/FAK (фокальная киназа адгезии).** Сосудистые сигнальные пути преобладают в образовании ВМ-сети. Среди молекул, вовлеченных в эти пути, – EphA2 и VE-кадгерин, определяющие некоторые свойства ВМ. Рецепторы эфрина представляют собой большое семейство тирозинкиназ – мембранных протеинов, участвующих в эмбриональном васкулогенезе и взрослом ангиогенезе. Клетки агрессивной меланомы экспрессируют различные эфриновые рецепторы и лиганды, включая EphA2 и его лиганд – Ephrin-A1 [23, 30, 31]. EphA2 экспрессируется эпителиальными клетками и важен для ангиогенеза взрослых и неоваскуляризации опухоли [32]. Он гиперэкспрессируется и фосфорилируется в агрессивных ВМ-формирующих опухолевых клетках увеальной меланомы *in vitro*, нарушение его регуляции предотвращает образование ВМ [19]. Ингибирование EphA2 в агрессивных клетках меланомы *in vitro* ведет к нарушению их способности формировать ВМ [33].

VE-кадгерин – трансмембранный протеин, молекула адгезии, специфичная для эндотелиоцитов и важная для эмбрионального васкулогенеза. Он гиперэкспрессируется *in vitro* в ВМ-формирующих клетках кожных и увеальных меланом, а его нокаут предотвращает формирование ВМ [34]. Генистеин – растительный эстроген, ингибитор ВМ в клетках увеальной меланомы *in vitro* и в мышечной ксеномодели увеальной меланомы (нарушает регуляцию VE-кадгерина) [35]. Подобно этому, ликорина гидрохлорид, активный компонент традиционной китайской медицины (*Lycoris radiata*), ингибирует формирование ВМ в культурах клеток кожной меланомы человека на примере мышечной ксеномодели, нарушая регуляцию экспрессии VE-кадгерина [36].

Оба фактора – EphA2 и VE-кадгерин – обнаруживаются в межклеточных контактах в культурах кожной и увеальной меланомы человека, а также на срезах ткани увеальной меланомы. Нокаут экспрессии VE-кадгерина ведет к перераспределению EphA2 на мембране и потере EphA2 из межклеточных

контактов с одновременным появлением его в цитоплазме [37]. Напротив, нокаут гена EphA2 не меняет локализации VE-кадгерина.

Действие EphA2 и VE-кадгерина опосредуется цитоплазматическими ферментами – FAK и фосфоинозитид-3-киназой (PI3K). Эти киназы подвергаются фосфорилированию в культурах клеток агрессивных меланом, а в клетках менее агрессивных меланом и нормальных меланоцитах – нет. Фермент FRNK прерывает сигнальный путь FAK, ингибирует развитие ВМ в агрессивной меланоме *in vitro*, нарушая регуляцию экстрацеллюлярных сигнал-регулирующих киназ 1 и 2 (ERK1/2) и урокиназную активность. При этом FRNK не воздействует на матриксные металлопротеазы (MT1-MMP и MMP2). Прямое ингибирование ERK1/2 приводит к снижению активности MT1-MMP и MMP2, указывая на существование альтернативных сигнальных путей, не зависящих от FAK, например сигнальный путь MAPK/ERK [38, 39]. Этот сигнальный путь связан с действием форсколина – ингибитора ВМ в клетках агрессивных меланом *in vitro* [40]. Форсколин продуцируется растением Indian Coleus и ингибирует ВМ за счет воздействия на PI3K. Также форсколин может активироваться протеином Epac/Rap1 [40]. Куркумин – природный фенол, ингибирует ВМ в мышечной алломоделе через нарушение регуляции EphA2, PI3K и MMP2 [41].

**Внеклеточный матрикс и металлопротеазы.** Нарушение регуляции EphA2 и VE-кадгерина изменяет активность металлопротеаз и ведет к расщеплению ламинина с перестройкой специфического опухолевого микроокружения. Ламинины – гликопротеины базальной мембраны.

Компоненты внеклеточного матрикса, связанные с клеточной мембраной через рецепторы интегринов, способны модулировать клеточную адгезию и дифференцировку. Часто наблюдается и обратный эффект. Например, клетки слабоагрессивной меланомы кожи, выращенные на матриксе из коллагена I типа, обработанном агрессивными (формирующими ВМ) клетками, экспрессируют панели генов, характерные для агрессивных клеток [42, 43]. Матриксные металлопротеазы – Zn-зависимые эндопептидазы, участвующие в деградации белков внеклеточного матрикса, и как результат этого вовлеченные во множество других функций: клеточную миграцию, пролиферацию, дифференцировку.

Обнаружено, что содержание MT1-MMP (синоним – MMP14), MMP2 и  $\gamma^2$ -цепей ламинина 5 повышено в клетках агрессивных кожных и увеальных меланом *in vitro*, и эти протеины локализуются в зонах ВМ, в то время как в клетках слабоагрессивных кожных и увеальных меланом их экспрессия снижена. Ингибирование MT1-MMP, MMP2 или  $\gamma^2$ -цепей

ламнина 5 препятствует развитию ВМ [42]. Было показано, что ингибирование PI3K ведет к снижению активности MT1-MMP (а также MMP2) и блокирует расщепление  $\gamma^2$ -цепей ламинина 5, т.е. блокирует становление ВМ в меланоме [44]. Талидомид ингибирует ВМ в мышинной алломоделе *in vivo*, нарушая регуляцию MMP2 и VEGF [45]. Доксациллин также снижает экспрессию MMP2, предотвращая развитие ВМ в мышинной алломоделе меланомы [46]. Тетрациклин-3 (синонимы: СМТ-3, COL-3) ингибирует экспрессию MMP2 и VE-кадгерина *in vitro* в клетках агрессивной меланомы, блокируя ВМ [47]. Вадимезан (синонимы: DMXAA, AS1404), разрывающая сосуды молекула, ингибирует экспрессию MMP2 в культурах клеток агрессивной меланомы, однако последующее добавление SB203 580 (селективного ингибитора p38 MAPK) восстанавливает ВМ без влияния на экспрессию MMP2 [48].

#### Эмбриональные молекулы стволовых клеток.

Как отмечалось выше, в опухолевых клетках, участвующих в ВМ, гиперэкспрессированы некоторые маркеры стволовых клеток. Наиважнейшие из этих молекул – Nodal и Notch. Nodal – регулятор стволовых клеток, экспрессируется в эмбриогенезе и принадлежит к семейству трансформирующего фактора роста бета (TGF $\beta$ ). Семейство рецептора Notch также важно для эмбриональных стволовых клеток, в нем выделяют 4 трансмембранных рецептора (Notch1–4) и 5 связанных с мембраной лигандов. Notch4 экспрессируется в эндотелиальных клетках, участвуя в развитии и перестройке сосудов, включая опухолевый ангиогенез. В клетках агрессивной меланомы экспрессируется только Notch4. Нарушение регуляции Notch4 снижает экспрессию Nodal в клеточных линиях агрессивной меланомы и нарушает формирование ВМ в клетках агрессивной меланомы. Добавление экзогенного Nodal к этим клеткам восстанавливает ВМ, а также экспрессию Nodal и VE-кадгерина. Очевидно, Notch4 запускает ВМ и способствует ей через нарушения регуляции экспрессии протеина Nodal [24, 49]. Воздействие на клетки агрессивной меланомы кожи человека антителами к Nodal ведет к снижению способности формировать ВМ [50].

**Гипоксия, индуцирующий гипоксию фактор 1 альфа (HIF1 $\alpha$ ), реактивные виды кислорода (ROS) и VEGF.** Гипоксия тканей играет важную роль в формировании сети ВМ в опухоли. Гипоксия стабилизирует фактор HIF1 $\alpha$ , который активирует экспрессию ряда генов (VEGF и др.), запуская процесс выживания при низком содержании кислорода. Гипоксия индуцирует экспрессию HIF1 $\alpha$ , MMP2 и VEGF, содействуя формированию ВМ *in vivo*. При инокуляции мышинных меланомных клеток в ишемизированные конечности мыши при неишемизированном контроле развиваются меланомы примерно равных разме-

ров в обоих типах конечностей, хотя начальный рост существенно быстрее при ишемии конечностей [51].

Онкоген BCL2 также участвует в индукции ВМ при гипоксии в культурах клеток меланомы [52]. В агрессивной меланоме при гипоксии повышается уровень ROS и HIF1 $\alpha$ , что усиливает способность клеток к формированию сети ВМ, в то время как ингибирование HIF1 $\alpha$  нарушает образование ВМ-сети *in vitro* и *in vivo* в алломоделе. Также ингибирование ROS блокирует развитие сети ВМ в мышинной алломоделе [53]. Все это частично объясняет низкую эффективность (нередко – метастатический эффект) антиангиогенной терапии, которая индуцирует гипоксию опухоли [54–56]. Антиоксиданты снижают уровень ROS, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, нарушая формирование ВМ в клетках кожной меланомы *in vitro* и в мышинной алломоделе [57].

Ингибиторы ангиогенеза – ангионекс, TNP-470 и эндостатин – не препятствуют формированию ВМ в клеточных культурах меланомы [58].

Внутриклеточный домен трансмембранного рецептора VEGFR-A – VEGFR1 обладает тирозинкиназной активностью и играет важную роль в физиологическом ангиогенезе. VEGFR1 гиперэкспрессируется в субпопуляции ABCB5-позитивных меланома-иницирующих клеток, связанных с ВМ. Нокдаун VEGFR1 ингибирует ВМ в мышинной ксеномоделе [26]. Трансмембранный рецептор VEGFR-C и VEGFR-D VEGFR3 также обладает тирозин-протеинкиназной активностью, играя важную роль в лимфангиогенезе. VEGFR3 участвует в формировании сети ВМ *in vitro* в культуре меланомы кожи [59]. Эндотелиновый рецептор В принимает участие во взаимодействии клеток меланомы и ее стромы, обеспечивая рост опухоли, неоваскуляризацию, лимфангиогенез и метастазирование. Существуют перекрестные связи между эндотелиновым рецептором В и VEGFR3 [59]. Эндотелин-1 в комбинации с VEGFC усиливает развитие сети ВМ по сравнению с их одиночным воздействием [59]. Отметим, что увеальные меланомы метастазируют гематогенным путем, а для диссеминации меланомы кожи важна также лимфатическая система.

**Другие молекулы и сигнальные пути трансдукции.** Облегчение кровотока для функционирования ВМ-каналов частично достигается нарушением свертывания крови. Регуляция тканевого фактора (TF), ингибиторов 1 и 2 TF-пути (TFPI1 и TFPI2) нарушена в агрессивных кожной и увеальной меланоме *in vitro* по сравнению с менее агрессивными. TF – поверхностный рецептор в каскаде коагуляции (внешний путь коагуляции), кофактор для фактора VIIa. Его активность в клетках меланомы регулируется TFPI1, облегчая циркуляцию жидкости в сети ВМ. Формирование ВМ может идти и альтернативным путем – через TFPI2 (коагуляция-независимый механизм).

Выключение TFPI2 подавляет активность MMP2, полностью блокируя формирование сети VM в агрессивных меланомах *in vitro* [18].

Дополнительные молекулы включают экстрацеллюлярные секретирующиеся протеины, например пигментный эпителиальный фактор, костный морфогенетический протеин 4, и интрацеллюлярные молекулы, например ингибитор связывания ДНК/дифференцировки протеин 2 и каспаза-3; все они, по современным литературным данным, принимают участие в формировании VM-каналов.

Пигментный эпителиальный фактор – гликопротеин суперсемейства ингибиторов сериновых протеаз. Он связывается с поверхностными рецепторами, его нокдаун в кожной меланоме тормозит VM *in vitro* [60].

Другой внеклеточный белок – BMP4 – запускает образование сети VM. BMP4 – секретирующийся фактор роста суперсемейства TGF $\beta$ . Он контролирует пролиферацию, дифференцировку, хемотаксис, подвижность и клеточную гибель. Соответственно, он связан с прогрессированием опухоли. Ингибирование BMP4 приводит к нарушению регуляции EphA2 и экспрессии VE-кадгерина – нарушает развитие VM в кожной меланоме *in vitro* [61, 62].

Каспаза-3 – еще один внутриклеточный белок, связанный с построением VM-сети. Каспазы – семейство цистеиновых протеаз, участвующих в апоптозе и ряде других процессов (пролиферация, дифференцировка, миграция). Высокий уровень каспазы-3 определяется в клетках сетей VM меланомы *in situ* по сравнению с другими клетками опухоли. Каспаза-3 способствует развитию VM за счет расщепления про-MMP2 с продукцией MMP2 [63]. Активная каспаза-3 запускает формирование сети VM. Апоптотический индекс всегда выше в агрессивных VM-формирующих меланомах *in vitro*, чем в слабоагрессивных, не формирующих VM [57]. Блокирование активности каспазы-3 разными ингибиторами блокирует и формирование сети VM [64].

Галектин-3 –  $\beta$ -галактозид-связывающий протеин семейства лектинов, участвующий в прогрессировании опухоли и метастазировании. Нокаут галектина-3 снижает экспрессию VE-кадгерина и фибронектина, блокирует формирование VM в агрессивной меланоме кожи *in vitro* и снижает

экспрессию VE-кадгерина и MMP2 в мышинной ксеномодели [65].

#### Перспективы терапевтического воздействия на васкулогенную мимикрию

Становление VM – сложный биологический процесс, в котором задействовано несколько сигнальных путей. Тот факт, что VM встречается в различных типах агрессивных опухолей (при раке молочной железы, простаты, яичника, легкого, почки, саркоме мягких тканей), свидетельствует о том, что мы имеем дело с новой характеристикой агрессивной опухоли. Накапливается все больше экспериментальных данных, указывающих на высокую статистическую корреляцию между способностью опухоли к VM и частотой метастазирования. Так, у пациентов с кожной и увеальной меланомой с участками VM прогноз хуже, чем у пациентов без VM в опухоли [9, 11, 66–69]. Возможно, это положение также справедливо и для других злокачественных новообразований [69].

К сожалению, в доброкачественных опухолях ангиогенез недостаточно изучен. Часто в качестве индекса для оценки распространенности ангиогенеза в опухолях используется микрососудистая плотность. Этот показатель выше в меланоме кожи по сравнению с невусами [70], что указывает на меньшую неоваскуляризацию доброкачественных образований. «Псевдоваскулярные пространства», выстланные меланоцитами, отмечены в 3 пигментных невусах [71] и в 3 меланоцитарных [72]. Кроме того, показано, что инъекция анестетика не вызывает развитие сосудистых пространств, что доказывает, что это не артефакт от инъекции [73]. Необходимы дальнейшие исследования невусов, особенно диспластических, чтобы выяснить связь между VM и риском малигнизации [74]. Идентификация VM в опухоли в перспективе поможет контролировать течение болезни в кожной и увеальной меланомах, а также и в других типах опухолей [75–77].

Очевидно, необходимы дальнейшие исследования VM, ее молекулярных детерминант и сигнальных путей. Обнаружение лекарственных препаратов, эффективно блокирующих VM, позволит обосновать новый подход к лечению агрессивной опухоли, что в итоге должно улучшить эффективность современных методов лечения злокачественных новообразований.

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

1. Jain R.K., Carmeliet P. SnapShot: Tumor angiogenesis. *Cell* 2012;149(6):1408–1408.e1. DOI: 10.1016/j.cell.2012.05.025. PMID: 22682256.
2. Hilen F., Griffioen A.W. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26(3–4):489–502. DOI: 10.1007/s10555-007-9094-7. PMID: 17717633.
3. Seftor R.E., Hess A.R., Seftor E.A. et al. Tumor cell vasculogenic mimicry: from controversy to therapeutic promise. *Am J Pathol* 2012;181(4):1115–25. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.07.013. PMID: 22944600.
4. Kirschmann D.A., Seftor E.A., Hardy K.M. et al. Molecular pathways: vasculogenic mimicry in tumor cells: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2012;18(10):2726–32. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3237. PMID: 22474319.
5. Qiao L., Liang N., Zhang J. et al. Advanced research on vasculogenic mimicry in cancer. *J Cell Mol Med* 2015;19(2):315–26. DOI: 10.1111/jcmm.12496. PMID: 25598425.
6. Chung H.J., Mahalingam M. Angiogenesis, vasculogenic mimicry and vascular invasion in cutaneous malignant melanoma – implications for therapeutic strategies and targeted therapies. *Expert Rev Anticancer Ther* 2014;14(5):621–39. DOI: 10.1586/14737140.2014.883281. PMID: 24506089.
7. Maniotis A.J., Folberg R., Hess A. et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999;155(3):739–52. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65173-5. PMID: 10487832.
8. Folberg R., Hendrix M.J., Maniotis A.J. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2000;156(2):361–81. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64739-6. PMID: 10666364.
9. Clarijs R., van Dijk M., Ruiter D.J., de Waal R.M. Functional and morphologic analysis of the fluid-conducting meshwork in xenografted cutaneous and primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;46(9):3013–20. DOI: 10.1167/iiov.04-0876. PMID: 16123395.
10. Frenkel S., Barzel I., Levy J. et al. Demonstrating circulation in vasculogenic mimicry patterns of uveal melanoma by confocal indocyanine green angiography. *Eye (Lond)* 2008;22(7):948–52. DOI: 10.1038/sj.eye.6702783. PMID: 17363922.
11. van Beurden A., Schmitz R.F., van Dijk C.M., Baeten C.I. Periodic acid Schiff loops and blood lakes associated with metastasis in cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 2012;22(6):424–9. DOI: 10.1097/CMR.0b013e328358b355. PMID: 23010821.
12. Chang Y.S., di Tomaso E., McDonald D.M. et al. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(26):14608–13. DOI: 10.1073/pnas.97.26.14608. PMID: 11121063.
13. di Tomaso E., Capen D., Haskell A. et al. Mosaic tumor vessels: cellular basis and ultrastructure of focal regions lacking endothelial cell markers. *Cancer Res* 2005;65(13):5740–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4552. PMID: 15994949.
14. Chen L., Zhang S., Li X. et al. A pilot study of vasculogenic mimicry immunohistochemical expression in intraocular melanoma model. *Oncol Rep* 2009;21(4):989–99. PMID: 19287998.
15. Maniotis A.J., Chen X., Garcia C. et al. Control of melanoma morphogenesis, endothelial survival, and perfusion by extracellular matrix. *Lab Invest* 2012;82(8):1031–43. PMID: 12177242.
16. Clarijs R., Otte-Holler I., Ruiter D.J., de Waal R.M. Presence of a fluid-conducting meshwork in xenografted cutaneous and primary human uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(4):912–8. PMID: 11923228.
17. Mueller A.J., Bartsch D.U., Folberg R. et al. Imaging the microvasculature of choroidal melanomas with confocal indocyanine green scanning laser ophthalmoscopy. *Arch Ophthalmol* 1998;116(1):31–9. PMID: 9445206.
18. Ruf W., Seftor E.A., Petrovan R.J. et al. Differential role of tissue factor pathway inhibitors 1 and 2 in melanoma vasculogenic mimicry. *Cancer Res* 2003;63(17):5381–9. PMID: 14500372.
19. Hess A.R., Seftor E.A., Gardner L.M. et al. Molecular regulation of tumor cell vasculogenic mimicry by tyrosine phosphorylation: role of epithelial cell kinase (Eck/EphA2). *Cancer Res* 2001;61(8):3250–5. PMID: 11309274.
20. Girouard S.D., Murphy G.F. Melanoma stem cells: not rare, but well done. *Lab Invest* 2011;91(5):647–64. DOI: 10.1038/labinvest.2011.50. PMID: 21445060.
21. Sajithlal G.B., McGuire T.F., Lu J. et al. Endothelial-like cells derived directly from human tumor xenografts. *Int J Cancer* 2010;127(10):2268–78. DOI: 10.1002/ijc.25251. PMID: 20162569.
22. Dunleavey J.M., Dudley A.C. Vascular mimicry: concepts and implications for anti-angiogenic therapy. *Curr Angiogenesis* 2012;1(2):133–8. DOI: 10.2174/2211552811201020133. PMID: 24729954.
23. Seftor E.A., Meltzer P.S., Schatteman G.C. et al. Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;44(1):17–27. PMID: 12398997.
24. McAllister J.C., Zhan Q., Weishaupt C. et al. The embryonic morphogen, Nodal, is associated with channel-like structures in human malignant melanoma xenografts. *J Cutan Pathol* 2010;37(Suppl 1):19–25. DOI: 10.1111/j.1600-0560.2010.01503.x. PMID: 20482672.
25. Khalkhali-Ellis Z., Kirschmann D.A., Seftor E.A. et al. Divergence(s) in Nodal signaling between aggressive melanoma and embryonic stem cells. *Int J Cancer* 2015;136(5):E242–51. DOI: 10.1002/ijc.29198. PMID: 25204799.
26. Frank N.Y., Schatton T., Kim S. et al. VEGFR-1 expressed by malignant melanoma-initiating cells is required for tumor growth. *Cancer Res* 2011;71(4):1474–85. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1660. PMID: 21212411.
27. Murphy G.F., Wilson B.J., Girouard S.D. et al. Stem cells and targeted approaches to melanoma cure. *Mol Aspects Med* 2014;39:33–49. DOI: 10.1016/j.mam.2013.10.003. PMID: 24145241.
28. Lai C.Y., Schwartz B.E., Hsu M.Y. CD133+ melanoma subpopulations contribute to perivascular niche morphogenesis and tumorigenicity through vasculogenic mimicry. *Cancer Res* 2012;72(19):5111–8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0624. PMID: 22865455.
29. Valyi-Nagy K., Kormos B., Ali M. et al. Stem cell marker CD271 is expressed by vasculogenic mimicry-forming uveal melanoma cells in three-dimensional cultures. *Mol Vis* 2012;18:588–92. PMID: 22419851.
30. Demou Z.N., Hendrix M.J. Microgenomics profile the endogenous

- angiogenic phenotype in subpopulations of aggressive melanoma. *J Cell Biochem* 2008;105(2):562–73. DOI: 10.1002/jcb.21855. PMID: 18655191.
31. Bittner M., Meltzer P., Chen Y. et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 2000;406(6795): 536–40. DOI: 10.1038/35020115. PMID: 10952317.
  32. Hess A.R., Margaryan N.V., Seftor E.A., Hendrix M.J. Deciphering the signaling events that promote melanoma tumor cell vasculogenic mimicry and their link to embryonic vasculogenesis: role of the Eph receptors. *Dev Dyn* 2007;236(12):3283–96. DOI: 10.1002/dvdy.21190. PMID: 17557303.
  33. Margaryan N.V., Strizzi L., Abbott D.E. et al. EphA2 as a promoter of melanoma tumorigenicity. *Cancer Biol Ther* 2009;8(3):279–88. PMID: 19223760.
  34. Hendrix M.J., Seftor E.A., Meltzer P.S. et al. Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(14):8018–23. DOI: 10.1073/pnas.131209798. PMID: 11416160.
  35. Cong R., Sun Q., Yang L. et al. Effect of Genistein on vasculogenic mimicry formation by human uveal melanoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;28:124. DOI: 10.1186/1756-9966-28-124. PMID: 19735546.
  36. Liu R., Cao Z., Tu J. et al. Lycorine hydrochloride inhibits metastatic melanoma cell-dominant vasculogenic mimicry. *Pigment Cell Melanoma Res* 2012;25(5):630–8. DOI: 10.1111/j.1755-148X.2012.01036.x. PMID: 22781316.
  37. Hess A.R., Seftor E.A., Gruman L.M. et al. VE-cadherin regulates EphA2 in aggressive melanoma cells through a novel signaling pathway: implications. *Cancer Biol Ther* 2006;5(2):228–33. PMID: 16481735.
  38. Hess A.R., Postovit L.M., Margaryan N.V. et al. Focal adhesion kinase promotes the aggressive melanoma phenotype. *Cancer Res* 2005;65(21):9851–60. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2172. PMID: 16267008.
  39. Hess A.R., Hendrix M.J. Focal adhesion kinase signaling and the aggressive melanoma phenotype. *Cell Cycle* 2006;5(5):478–80. DOI: 10.4161/cc.5.5.2518. PMID: 16552181.
  40. Lissitzky J.C., Parriaux D., Ristorcelli E. et al. Cyclic AMP signaling as a mediator of vasculogenic mimicry in aggressive human melanoma cells in vitro. *Cancer Res* 2009;69(3):802–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2391. PMID: 19176384.
  41. Chen L.X., He Y.J., Zhao S.Z. et al. Inhibition of tumor growth and vasculogenic mimicry by curcumin through down-regulation of the EphA2/PI3K/MMP pathway in a murine choroidal melanoma model. *Cancer Biol Ther* 2011;11(2):229–35. PMID: 21084858.
  42. Seftor R.E., Seftor E.A., Koshikawa N. et al. Cooperative interactions of laminin 5  $\gamma$ 2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res* 2011;71(17):6322–7. PMID: 11522618.
  43. Seftor E.A., Meltzer P.S., Kirschmann D.A. et al. The epigenetic reprogramming of poorly aggressive melanoma cells by a metastatic microenvironment. *J Cell Mol Med* 2006;10(1):174–96. PMID: 16563230.
  44. Hess A.R., Seftor E.A., Seftor R.E., Hendrix M.J. Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry. *Cancer Res* 2003;63(16):4757–62. PMID: 12941789.
  45. Zhang S., Li M., Gu Y. et al. Thalidomide influences growth and vasculogenic mimicry channel formation in melanoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2008;27:60. DOI: 10.1186/1756-9966-27-60. PMID: 18983651.
  46. Zhang S., Zhang D., Sun B. Vasculogenic mimicry: current status and future prospects. *Cancer Lett* 2007;254(2):157–64. DOI: 10.1016/j.canlet.2006.12.036. PMID: 17306454.
  47. Seftor R.E., Seftor E.A., Kirschman D.A., Hendrix M.J. Targeting the tumor microenvironment with chemically modified tetracyclines: inhibition of laminin 5  $\gamma$ 2 chain promigratory fragments and vasculogenic mimicry. *Mol Cancer Ther* 2002;1(13): 1173–9. PMID: 12479698.
  48. Zhao L., Marshall E.S., Kelland L.R., Baguley B.C. Evidence for the involvement of p38 MAP kinase in the action of the vascular disrupting agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA). *Invest New Drugs* 2007;25(3):271–6. DOI: 10.1007/s10637-006-9029-0. PMID: 17203401.
  49. Hardy K.M., Kirschmann D.A., Seftor E.A. et al. Regulation of the embryonic morphogen Nodal by Notch4 facilitates manifestation of the aggressive melanoma phenotype. *Cancer Res* 2010;70(24):10340–50. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0705. PMID: 21159651.
  50. Strizzi L., Postovit L.M., Margaryan N.V. et al. Nodal as a biomarker for melanoma progression and a new therapeutic target for clinical intervention. *Expert Rev Dermatol* 2009;4(1):67–78. DOI: 10.1586/17469872.4.1.67. PMID: 19885369.
  51. Sun B., Zhang D., Zhang S. et al. Hypoxia influences vasculogenic mimicry channel formation and tumor invasion-related protein expression in melanoma. *Cancer Lett* 2007;249(2):188–97. DOI: 10.1016/j.canlet.2006.08.016. PMID: 16997457.
  52. Zhao N., Sun B.C., Sun T. et al. Hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation via VE-cadherin regulation by Bcl-2. *Med Oncol* 2012;29(5):3599–607. DOI: 10.1007/s12032-012-0245-5. PMID: 22562824.
  53. Comito G., Calvani M., Giannoni E. et al. HIF-1 $\alpha$  stabilization by mitochondrial ROS promotes MET-dependent invasive growth and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *Free Radic Biol Med* 2011;51(4):893–904. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.042. PMID: 21703345.
  54. Wu S., Singh R.K. Resistance to chemotherapy and molecularly targeted therapies: rationale for combination therapy in malignant melanoma. *Curr Mol Med* 2011;11(7):553–63. PMID: 21707515.
  55. Benazzi C., Al-Dissi A., Chau C.H. et al. Angiogenesis in spontaneous tumors and implications for comparative tumor biology. *Scientific World Journal* 2014;2014:919570. DOI: 10.1155/2014/919570. PMID: 24563633.
  56. Schnegg C.I., Yang M.H., Ghosh S.K., Hsu M.Y. Induction of vasculogenic mimicry overrides stem-like cancer cells in melanoma. *Cancer Res* 2015;75(8):1682–90. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1855. PMID: 25769726.
  57. Vartanian A.A., Burova O.S., Stepanova E.V. et al. Melanoma vasculogenic mimicry is strongly related to reactive oxygen species level. *Melanoma Res* 2007;17(6):370–9. DOI: 10.1097/CMR.0b013e3282f1d2ec. PMID: 17992120.
  58. van der Schaft D.W., Seftor R.E., Seftor E.A. et al. Effects of angiogenesis inhibitors on vascular network formation

- by human endothelial and melanoma cells. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(19):1473–7. DOI: 10.1093/jnci/djh267. PMID: 15467037.
59. Spinella F., Caprara V., Di Castro V. et al. Endothelin-1 induces the transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and modulates cell migration and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *J Mol Med (Berl)* 2013;91(3):395–405. DOI: 10.1007/s00109-012-0956-2. PMID: 22965194.
60. Orgaz J.L., Ladhani O., Hoek K.S. et al. Loss of pigment epithelium derived factor enables migration, invasion and metastatic spread of human melanoma. *Oncogene* 2008;28(47):4147–61. DOI: 10.1038/onc.2009.284. PMID: 19767774.
61. Rothhammer T., Bataille F., Spruss T. et al. Functional implication of BMP4 expression on angiogenesis in malignant melanoma. *Oncogene* 2007;26(28):4158–70. DOI: 10.1038/sj.onc.1210182. PMID: 17173062.
62. Su F., Li B., Wang J. et al. Molecular regulation of vasculogenic mimicry in human uveal melanoma cells: role of helix-loop-helix ID2. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009;247(3):411–9. DOI: 10.1007/s00417-008-1008-z. PMID: 19043732.
63. Liu Y.R., Sun B., Zhao X.L. et al. Basal caspase-3 activity promotes migration, invasion, and vasculogenic mimicry formation of melanoma cells. *Melanoma Res* 2013;23(4):243–53. DOI: 10.1097/CMR.0b013e3283625498. PMID: 23695439.
64. Vartanian A.A., Burova O.S., Stepanova E.V., Baryshnikov A.Y. The involvement of apoptosis in melanoma vasculogenic mimicry. *Melanoma Res* 2007;17(1):1–8. DOI: 10.1097/CMR.0b013e3280112b76. PMID: 17235236.
65. Mourad-Zeidan A.A., Melnikova V.O., Wang H. et al. Expression profiling of galectin-3-depleted melanoma cells reveals its major role in melanoma cell plasticity and vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 2008;173(6):1839–52. DOI: 10.2353/ajpath.2008.080380. PMID: 18988806.
66. Makitie T., Summanen P., Tarkkanen A., Kivela T. Microvascular loops and networks as prognostic indicators in choroidal and ciliary body melanomas. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(4):359–67. PMID: 10050870.
67. Folberg R., Rummelt V., Parys-Van Ginderdeuren R. et al. The prognostic value of tumor blood vessel morphology in primary uveal melanoma. *Ophthalmology* 1993;100(9):1389–98. PMID: 8371929.
68. Warso M.A., Maniotis A.J., Chen X. et al. Prognostic significance of periodic acid-Schiff-positive patterns in primary cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res* 2001;7(3):473–7. PMID: 11297236.
69. Cao Z., Bao M., Miele L. et al. Tumour vasculogenic mimicry is associated with poor prognosis of human cancer patients: a systemic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2013;49(18):3914–23. DOI: 10.1016/j.ejca.2013.07.148. PMID: 23992642.
70. Einspahr J.G., Thomas T.L., Saboda K. et al. Expression of vascular endothelial growth factor in early cutaneous melanocytic lesion progression. *Cancer* 2007;110(11):2519–27. DOI: 10.1002/cncr.23076. PMID: 17932890.
71. Modlin R.L., Gottlieb B., Taylor C., Rea T.H. Identification of cells lining pseudovascular spaces of benign pigmented nevi. *Am J Dermatopathol* 1984;6 Suppl:25–9. PMID: 6084957.
72. Lee K.H., Han Y.W., Park C.J. Three cases of melanocytic nevi with pseudovascular spaces. *Korean J Dermatol* 2007;45(1):90–3.
73. Demitsu T., Kakurai M., Yamada T. et al. The vascular space-like structure in melanocytic nevus is not an injection artifact: report of a case and an experimental study. *J Dermatol* 1998;25(3):143–9. PMID: 9575674.
74. Goldstein A.M., Tucker M.A. Dysplastic nevi and melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013;22(4):528–32. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-12-1346. PMID: 23549396.
75. Coupland S.E., Lake S.L., Zeschnigk M., Damato B.E. Molecular pathology of uveal melanoma. *Eye* 2013;27(2):230–42. DOI: 10.1038/eye.2012.255. PMID: 23222563.
76. Chang S.H., Worley L.A., Onken M.D., Harbour J.W. Prognostic biomarkers in uveal melanoma: evidence for a stem cell-like phenotype associated with metastasis. *Melanoma Res* 2008;18(3):191–200. DOI: 10.1097/CMR.0b013e3283005270. PMID: 18477893.
77. Gould Rothberg B.E., Bracken M.B., Rimm D.L. Tissue biomarkers for prognosis in cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2009;101(7):452–74. DOI: 10.1093/jnci/djp038. PMID: 19318635.

**ORCID авторов/ORCID of authors**

A.M. Казаков/A.M. Kazakov: <https://orcid.org/0000-0002-9534-2729>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

# ХОНДРОИТИНА СУЛЬФАТ НАТРИЯ – ПРИМЕСИ И ПРОБЛЕМЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Е.Л. Комарова<sup>1</sup>, С.В. Чернова<sup>2</sup>, К.В. Касумова<sup>2</sup>,  
М.С. Табачная<sup>2</sup>, Л.В. Овсянникова<sup>2</sup>, К.И. Эллер<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ООО «Продэкспертиза»; Россия, 117149 Москва, Симферопольский б-р, 8, оф. 1;

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

<sup>3</sup>ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии»;  
Россия, 109240 Москва, Устьинский проезд, 2/14

**Контакты:** Елена Леонидовна Комарова [kotelia@mail.ru](mailto:kotelia@mail.ru)

В статье рассмотрены современные исследования в области химического строения хондроитина сульфата (ХС) и его фармакологической активности. Показано, что клиническая эффективность и безопасность зависит от природы и качества используемого для производства сырья, способов технологической переработки, степени очистки. Состав ХС переменный и представляет собой смесь 2 основных изомерных форм – хондроитина 4-сульфат (Х4С) и хондроитина 6-сульфат (Х6С). В тканях молодых животных преобладает Х4С, содержание которого составляет ~70 %, а содержание Х6С ~30 %. Хрящи акул и других гидробионтов имеют низкое содержание Х4С (~10 %), а Х6С – около 80 %. Сложная полимерная структура и непостоянство состава ХС осложняют задачу стандартизации препаратов на его основе. Рассмотрены примеси, встречающиеся в субстанциях. Примеси разделены на 3 группы: родственные, технологические и механические, несвойственные ХС. Проведен сравнительный анализ требований к сырью и методов анализа ХС по нормативной документации различных стран и выявлено их значительное различие. Показано, что для повышения фармакологической активности производитель лекарственных препаратов должен учитывать все параметры субстанции ХС, включая структурный состав, молекулярную массу, наличие примесей.

**Ключевые слова:** хондроитина сульфат, химическое строение, стандартизация

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-25-36

## CHONDROITIN SODIUM SULFATE – IMPURITIES AND STANDARDIZATION PROBLEMS (LITERATURE REVIEW)

E.L. Komarova<sup>1</sup>, S.V. Chernova<sup>2</sup>, K.V. Kasumova<sup>2</sup>, M.S. Tabachnaya<sup>2</sup>, L.V. Ovsyannikova<sup>2</sup>, K.I. Eller<sup>3</sup>

<sup>1</sup>LLC “Prodeksperitiza”; of. 1, 8 Simferopolsky Blvd., 117149 Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation;  
Build. 2, 8 Trubetskaya St., 119991 Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Federal Research Center of Nutrition and Biotechnology; 2/14 Ustyinsky Proezd, 109240 Moscow, Russia

Modern research in the field of chondroitin sulfate chemical composition is considered. Clinical efficiency and safety are shown to depend on the nature and quality of the raw material used, ways of its technological processing and the degree of purification. The composition of chemical compounds (CC) variable is stated to represent the mixture of 2 main isomeric forms: chondroitin 4-sulfate and chondroitin 6-sulfate. In the animal tissue chondroitin 4-sulfate dominates, the content of which is 70 %; the content of chondroitin 6-sulfate is 30 %. The cartilages of sharks and other hydrobionts have got low content of chondroitin 4-sulfate (10 %) and chondroitin 6-sulfate 80 %. Complex polymeric structure and instability of CC composition make the problem of drug standardization on its basis complicated. The impurities encountered in substances are considered. The impurities are divided into several groups: related impurities, technological or mechanical ones uncharacteristic of CC. Comparative analysis of requirements for raw material from the point of view of normative documentation of different countries is carried out and their considerable difference is detected. It has been shown that for raising pharmacological activity the producer of drugs must take into account all the parameters of CC including the structural composition, molecular weight and presence of impurities.

**Key words:** chondroitin sulfate, chemical composition, standardization

### Введение

Оценка качества биологических лекарственных препаратов (ЛП) имеет определенные сложности. Это обусловлено тем, что биологические ЛП имеют сложное высокомолекулярное строение, обладают большой вариабельностью, производство включает использование различных тканей организмов и соответственно сложный состав возможных примесей. Все это требует большого количества работ при составлении стандарта качества на готовый препарат.

Большой интерес в фармацевтической отрасли и в производстве биологически активных добавок представляют препараты группы хондропротекторов. Благодаря современным исследованиям в области химического строения и фармакологической активности хондроитина сульфата (ХС) и других гликозаминогликанов (ГАГ), объем продаж продукции этой группы растет, а сфера применения расширяется [1–4]. С ростом востребованности субстанций ХС одновременно возрастает поток сырья низкого качества. Выявлены такие проблемы, как снижение уровня очистки субстанций, увеличение содержания различных примесей, включая присутствие других ГАГ, искусственное разбавление субстанций ХС растительными полисахаридами, другими химическими соединениями и т. д. [5–8].

**Цель работы** – изучение проблем проверки качества субстанций ХС с учетом понимания зависимости фармакологической активности ХС от его состава.

### Структура гликозаминогликанов

ХС является представителем ГАГ, роль которых в организме разнообразна: регуляция водного баланса, контроль диффузии различных соединений в межклеточном пространстве дермы, опора для клеток во время их миграции и др. [9–12].

ГАГ большей частью относятся к полисахаридам соединительной ткани животных (кожа, хрящи, роговица, суставная жидкость). Первоначально представителей этой группы соединений называли мукополисахаридами (от лат. *mucus* – слизь), так как они были обнаружены в слизистых секретах (мукоза) и придавали секретам вязкие, смазочные свойства [13–15].

ГАГ – это линейные гетерополисахариды с молярной массой не менее 4–5 тыс. г/моль, макромолекулы которых состоят из многократно повторяющихся дисахаридных звеньев (что позволяет также отнести их к биополимерам). Дисахаридные звенья ГАГ содержат остатки глюкуроновой кислоты (GlcUA) или  $\alpha$ -L-идуроновой кислоты (IdoUA), связанные с остатком глюкозамина (GlcN) или галактозамина (GalN) (табл. 1, рис. 1) [9–16]. Полисахаридные

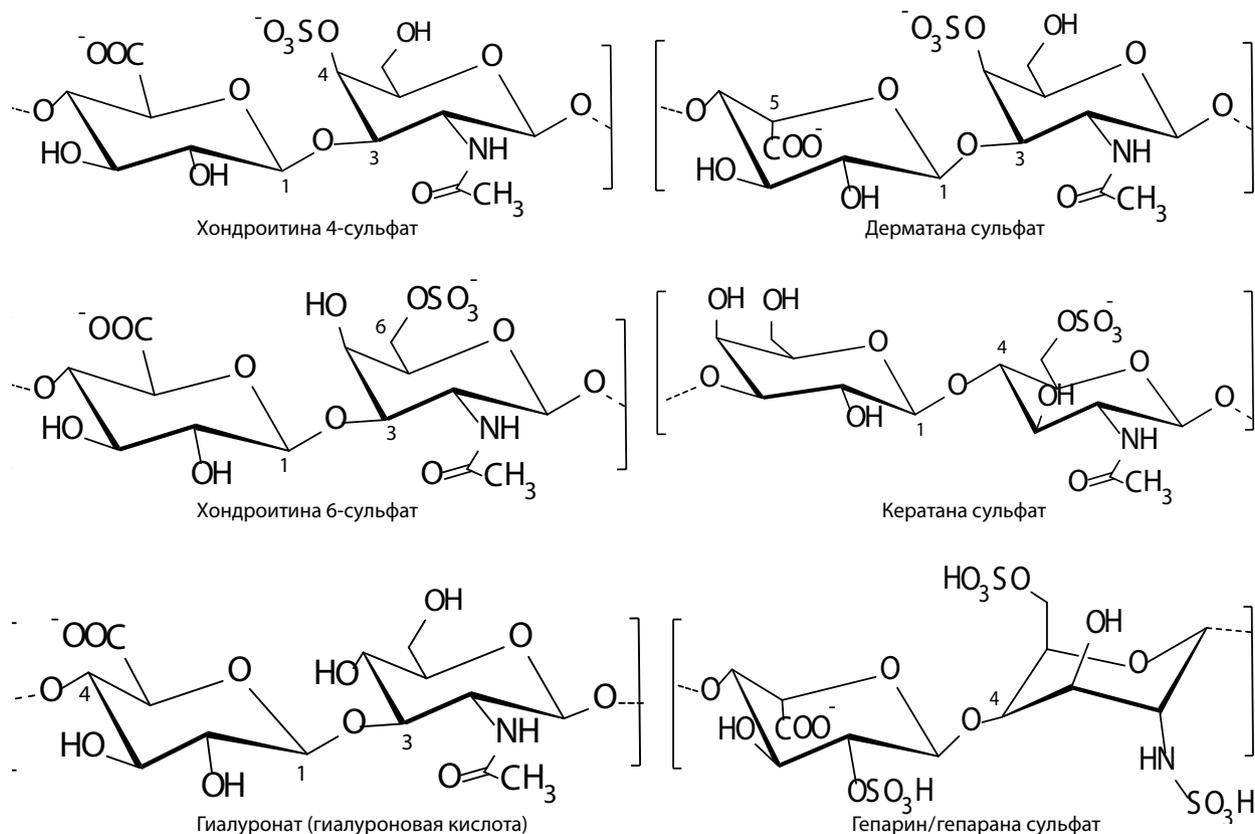


Рис. 1. Структурные формулы ГАГ

Таблица 1. Некоторые представители ГАГ

| Структурная группа, наименование  | Особенности дисахаридного состава ГАГ   | Где содержится или был обнаружен   |
|-----------------------------------|---|--|
| (I) Гиалуриновая кислота          | Состоит из остатков D-глюкуроновой кислоты и D-N-ацетилглюкозамина<br>GlcUA $\beta$ 1–3GlcNAc $\beta$ 1–4<br>Молекулярная масса (ММ) = от $5 \times 10^3$ до $20000 \times 10^3$ Да | Является главным компонентом синовиальной жидкости, отвечающим за ее вязкость, суставного хряща, в котором присутствует в виде оболочки каждой клетки (хондроцита), входит в состав кожи, где участвует в регенерации ткани [17]. Содержится в пуповине, стекловидном теле, легких, почках, головном мозге, мышечной ткани, в гребнях петуха и т. д.   |
| (II) Кератана сульфат             | Содержит N-ацетил-D-глюкозамин-6-сульфат и D-галактозу<br>Gal(6S) $\beta$ 1–4GlcNAc(6S) $\beta$ 1–3<br>ММ = от $4 \times 10^3$ до $20 \times 10^3$ Да                               | Впервые выделен из роговицы глаза, позднее найден и в других тканях, включая кости скелета. Обнаружено, что протеогликановые комплексы КС в скелете и роговице различаются структурно и имеют разный метаболизм. КС присутствует в центральной нервной системе, обнаружена его функция как регулятора регенерации нейронов.<br>В роговице, по данным сравнительного исследования, содержится в 10 раз больше КС, чем в хряще, и в 2–4 раза больше, чем в какой-либо иной ткани [18–22] |
| (III) Хондроитина 4-сульфат (Х4С) | GlcUA $\beta$ 1–3'GalNAc $\beta$ 1–4<br>Сульфатная группа этерифицирована по 4-му положению – GalNAc(4S)<br>ММ = от $5 \times 10^3$ до $100 \times 10^3$ Да                         | Содержится в хрящевых и костных тканях, в трахеях, сердечных перегородках, преобладает в тканях животных и человека (~70 %) [15, 16, 23–26]  |
| (III) Хондроитина 6-сульфат (Х6С) | GlcUA $\beta$ 1–3'GalNAc $\beta$ 1–4<br>Сульфатная группа этерифицирована по 6-му положению – GalNAc(6S)<br>ММ = от $5 \times 10^3$ до $100 \times 10^3$ Да                         | Содержится в хрящевых и костных тканях. Х6С преобладает в тканях гидробионтов (до 80 %), ранее его получали из хрящей (плавников) акулы [15, 16, 23–26]  |
| (III) ХС D                        | Хондроитина-2,6-сульфат, «сверхсульфатированный» хондроитин по 2-му положению глюкуроновой кислоты<br>GlcUA(2S) и по 6-му положению – GalNAc(6S)                                    | Хрящи акулы [27]   |
| (III) ХС E                        | Хондроитина-4,6-сульфат, «сверхсульфатированный» хондроитин по положениям 4 и 6 GalNAc(4S,6S)   | Хрящи кальмара [28]  |
| (III) ХС K                        | «Сверхсульфатированный» хондроитин<br>GlcA-3-SO <sub>4</sub> -GalNAc-4-SO <sub>4</sub>  | Хрящи королевского краба [27]  |
| (III) Дерматана сульфат (ДС)      | Состоит из D-галактозамина и L-идуроновой или D-глюкуроновой кислот<br>IdoUA $\beta$ 1–3-GalNAc $\beta$ 1–4<br>ММ = от $15 \times 10^3$ до $40 \times 10^3$ Да                      | Преобладает в тканях кожи, также встречается в сердечных клапанах, сухожилиях и стенках артерий, легких, лошадиной аорте, пуповине, коже свиньи, слизистой оболочке кишечника свиней, селезенке, межпозвоночном диске, мениске и др. [30–33]   |
| (III) Полисульфатированный ДС     | «Сверхсульфатированный» дерматан (или ХСН)<br>IdA-, IdA-2-SO <sub>4</sub> или -3-SO <sub>4</sub> -GalNAc-4,6-diSO <sub>4</sub>  | Хрящевые пластины миксин, кожа миксин [29]   |
| (IV) Гепарин                      | Состоит из сульфатированных глюкозамина и уроновой кислоты<br>IdoUA(2S) $\alpha$ 1–4GlcNS(6S) $\alpha$ 1–4<br>ММ = от $6 \times 10^3$ до $25 \times 10^3$ Да                        | Компонент внутриклеточных гранул тучных клеток, выстилающих артерии легких, печени и кожи, слизистой оболочки кишечника крупного рогатого скота и других животных – свиней, овец, кур, моллюсков [34]  |
| (IV) Гепарана сульфат             | GlcUA $\beta$ 1–4GlcNAc $\alpha$ 1–4<br>ММ = от $5 \times 10^3$ до $12 \times 10^3$ Да  | Базальные мембраны, компоненты клеточных поверхностей [34]   |

**Обозначения:** GlcUA =  $\beta$ -D-глюкуроновая кислота; GlcUA(2S) = 2-O-сульфо- $\beta$ -D-глюкуроновая кислота; GlcNS(6S) =  $\alpha$ -D-N-сульфо-глюкозамин-6-O-сульфат; IdoUA =  $\alpha$ -L-идурононовая кислота; IdoUA(2S) = 2-O-сульфо- $\alpha$ -L-идурононовая кислота; Gal =  $\beta$ -D-галактоза; Gal(6S) = 6-O-сульфо- $\beta$ -D-галактоза; GalNAc =  $\beta$ -D-N-ацетилгалактозамин; GalNAc(4S) =  $\beta$ -D-N-ацетилгалактозамин-4-O-сульфат; GalNAc(6S) =  $\beta$ -D-N-ацетилгалактозамин-6-O-сульфат; GalNAc(4S,6S) =  $\beta$ -D-N-ацетилгалактозамин-4-O-, 6-O-сульфат; GlcNAc =  $\alpha$ -D-N-ацетилглюкозамин; GlcNS =  $\alpha$ -D-N-сульфоглюкозамин; GlcNS(6S) =  $\alpha$ -D-N-сульфоглюкозамин-6-O-сульфат.

цепи ГАГ соединены ковалентной связью с белками и образуют протеогликаны. Другими словами, это полимерные углевод-белковые комплексы с преимущественным содержанием углеводной части (70–80 %).

Известно 6 типов ГАГ: ХС, дерматана сульфат (ДС), кератана сульфат (КС), гепарана сульфат (ГС), гепарин и гиалуроновая кислота (ГК) (см. рис. 1).

За исключением ГК все ГАГ являются сульфатированными макромолекулами (полиэлектролитами) с различной степенью плотности заряда из-за переменного числа сульфогрупп, связанных с полисахаридной основой в разных местах. Большинство N-ацетилгалактозаминовых остатков сульфатированы в 4-м и 6-м положениях. В целом комплексы протеингликановой природы представляют собой поливалентные ионы, способные связывать катионы  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ .

Различие в строении всех ГАГ основано на углеводной структуре основной цепи, и они подразделяются на 4 структурные группы (табл. 2, см. рис. 1) [15, 16]:

- (I) ГК;
- (II) КС;
- (III) ХС/ДС;
- (IV) гепарин/ГС.

Таблица 2. Фармакологические свойства ГАГ

| Структурная группа, наименование ГАГ | Фармакологическая группа (активность)  |
|--------------------------------------|--|
| (III) ХС (смесь ХС А и С)            | Корректор метаболизма костной и хрящевой ткани (хондропротектор), имеет противовоспалительные, гипотензивные свойства. Снижает пролиферацию миобластов в присутствии bFGF [39]   |
| (III) ДС                             | Антикоагулянт, стабилизирует коллагеновые пучки, обеспечивает прозрачность роговицы. Другое название – beta-Нерагин. Увеличивает пролиферацию миобластов в присутствии bFGF [39]   |
| (IV) Гепарин/ГС                      | Антикоагулянт и антитромботическое средство, создает фильтрационный барьер в почках [10] Увеличивает пролиферацию миобластов в присутствии bFGF [39]   |
| (II) КС                              | Установлена активность в формировании глиальных рубцов при повреждениях мозга [18], положительная активность в поддержании прозрачности роговицы, пребиотическая активность [9, 10, 21, 22]. В последнее время фармакологическая активность КС интенсивно изучается с целью разрешения его применения в качестве лекарственной субстанции [19, 20] |
| (I) ГК                               | Структурообразующий компонент в офтальмологических препаратах и в косметике [40]   |

ХС в животных тканях, как правило, существует в форме протеогликанов. Его полисахаридные цепи с помощью связывающих белков прочно связываются

с ГК, образуя очень большие агрегаты. Эти агрегаты можно наблюдать в электронном микроскопе. Подобные структуры придают хрящам более твердую консистенцию и вместе с тем большую упругость. Общая молекулярная масса (ММ) мономерного протеогликана составляет  $(1,5–2,5) \times 10^6$  Да. Протеогликаны совместно с макромолекулами коллагена (главным образом II типа) обеспечивают уникальные свойства экстрацеллюлярного матрикса: растяжимость ткани и ее устойчивость к компрессии [9–16].

Субстанции ХС представляют собой смесь 2 основных структурных изомеров: Х4С (ХС А) и Х6С (ХС С), соотношение которых переменное и зависит от происхождения ХС. Известны и другие формы ХС, обнаруженные в основном в тканях гидробионтов, – Н, К, D, Е и др. Дисахаридные единицы ХС состоят из D-галактозамина и D-глюкуроновой кислоты (см. рис. 1, табл. 1) [2, 15, 16, 23, 24].

ДС ранее имел наименование «Хондроитина сульфат В», но был выведен из группы ХС из-за разницы в фармакологической активности (см. табл. 2). По строению ДС отличается от ХС тем, что в нем остаток глюкуроновой кислоты эпитимизован до идуроновой кислоты (см. рис. 1, табл. 1).

#### Фармакологическая активность гликозаминогликанов

Практически все ГАГ находят применение в медицинской практике, однако их фармакологическая активность различается и зависит от структуры полисахарида. Из всех ГАГ только ХС относится к группе корректоров метаболизма костной и хрящевой ткани, хондропротекторов и хондростимулирующих средств (см. табл. 2). Обнаружена способность ХС угнетать действие специфических ферментов, разрушающих соединительную ткань, в том числе лизосомальных ферментов, высвобождающихся в результате разрушения хондроцитов (эластаза, пептидаза, катепсин, интерлейкин-1 и др.) [35–37].

Препараты, содержащие ХС, принимают длительно, в течение нескольких месяцев, так как эффект действия хондропротекторов проявляется более медленно по сравнению с симптоматическими средствами – нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП) [38]. Совместная терапия позволяет снизить время приема средств группы НПВП.

Обнаружена зависимость противовоспалительных свойств ХС от его структурного состава, который, в свою очередь, зависит от вида животного сырья, используемого для производства ХС, – бычьих хрящи, трахеи свиней, кур или ткани ската [41]. Изучение гипотензивной активности ХС произведенного из бычьих и куриных хрящей, показало, что бычий ХС обладает более быстрым, но кратковременным действием относительно куриного ХС,

гипотензивная активность куриного ХС была более выраженной [42].

Клинические исследования влияния изомеров ХС при атеросклерозе в зависимости от расположения сульфогрупп и их количества в молекуле выявили, что эффективность изомеров при пероральном приеме снижается в следующем порядке: хондроитина полисульфат > Х4С > Х6С [43].

Для изготовления пищевых добавок и ЛП используют низкомолекулярный ХС, так как было обнаружено, что низкомолекулярный ХС (средняя ММ около 16900 Да) имел лучшую биологическую доступность и был более эффективен в качестве хондропротектора. Использование высокомолекулярного ХС не давало желаемого фармакологического эффекта [44, 45].

### Технология производства

Как известно, состав и качество субстанций ХС, а соответственно фармакологическая активность, клиническая эффективность и безопасность зависят от природы и качества используемого для производства сырья, способов его технологической переработки, степени очистки и др. (табл. 3) [1, 2, 45–48].

Основными источниками ХС являются хрящевые ткани крупного рогатого скота, свиней, птицы [49, 50], акулы хрящи в последнее время используются реже из-за дефицита сырья, однако отмечен рост производства ХС из тканей разнообразных гидробионтов [13, 42, 46–53] (см. табл. 1).

Технологии производства ХС представляют собой многостадийные процессы гидролиза хрящевых тканей с последующей очисткой. Классический метод производства ХС включает гидролиз животных хрящей при температуре в интервале от 35 до 95 °С,

в процессе которого тщательно контролируется рН среды и используются специальные реакторы, так как недопустим контакт реакционной смеси с металлической поверхностью. По завершении гидролиза реакционную смесь нейтрализуют, используя слабые щелочные реагенты, после чего очищают до получения субстанции, отвечающей требуемой спецификации (технического, пищевого, фармацевтического качества).

Технологии производства постоянно совершенствуются, предлагаются новые способы переработки, включающие ферментативные методы гидролиза, биотехнологические способы производства, унифицированные способы очистки или использование новых видов сырья – тканей различных животных, птиц или рыб [13, 49–54].

### Проблемы стандартизации хондроитина сульфата

Потребители субстанций ХС, производители готовых ЛП, биологически активных добавок или косметики не могут непосредственно контролировать процессы изготовления субстанции. Это определяет особую актуальность и повышенное внимание к проблеме безопасности ЛП. Единственным способом контроля качества пищевых и лекарственных субстанций является проверка их соответствия нормативной документации (НД).

Отсутствие единых требований к качеству продукции и несвоевременное совершенствование НД может привести к появлению на рынке некачественных лекарственных субстанций, как это произошло с родственным ГАГ – гепарином.

В 2008 г. США предъявили претензии производителям инъекционных субстанций гепарина, так как было обнаружено загрязнение гепарина примесями

Таблица 3. Примеси, встречающиеся в субстанциях ХС

| Группа примесей  | Тип примесей   | Примечание  |
|--|--|---|
| 1-я группа – специфические или родственные примеси (другие типы ГАГ) | 1 – ДС<br>2 – КС (попадает при использовании других тканей животных, составляет более 15 % в субстанциях, произведенных из акульих хрящей и гидробионтов)<br>3 – ГС и др.  | Примеси одного структурного ряда, родственные ГАГ. Для обнаружения этой группы примесей требуется использование высокотехнологичных методов анализа (электрофорез, ядерный магнитный резонанс (ЯМР), инфракрасный (ИК), энзимный методы анализа)  |
| 2-я группа – посторонние примеси технологические или механические    | Протеины и др.   | Низкая степень очистки сырья, производственные проблемы, большей частью могут быть стандартизованы по действующим нормативным документам  |
| 3-я группа – примеси, несвойственные сырью                           | 1 – Другие растительные полисахариды (мальтодекстрин, каррагинаны, альгинаты и др.)<br>2 – Моно-, дисахариды (глюкозамин, лактоза)<br>3 – Неорганические соединения, соли (натрия сульфат, натрия гексаметафосфат) | Примеси, обусловленные прямой фальсификацией сырья: подмена ХС костной мукой или отходами его производства, разбавление более дешевыми субстанциями, подмена ХС сходными по химическим свойствам анионными полисахаридами. Для обнаружения ряда таких примесей требуются высокотехнологичные методы анализа |

сверхсульфатированного ХС, обусловленное удешевлением технологии производства. Это привело не только к серьезным побочным реакциям при применении препарата, но и к смертельным случаям. После чего НД, стандартизирующая качество гепарина, была пересмотрена как в США, так и в других странах мира, включая РФ (Информационное письмо Руководителя Росздравнадзора № 03–578/08 от 08.09.2008), и дополнена более совершенными, в соответствии с научным и техническим прогрессом, методами контроля качества, такими как ЯМР-спектрометрия, ИК-спектрофотометрия, электрофорез [55, 56].

Этот случай заставил более внимательно относиться к стандартизации и других сложных полисахаридов, включая ХС, так как создание качественных, безопасных лекарственных средств – основная задача фармации.

Стандартизация субстанций ХС в США и странах ЕС проводится по общим фармакопейным статьям (Eur. Ph. 7, Br. Ph., USP29, «Chondroitin sulfate sodium»), на территории РФ ранее использовали общую фармакопейную статью (ФС 42-3741-99), в настоящее время ее заменили фармакопейные статьи предприятий. Между тем проблема идентификации субстанций ХС, определения его состава и примесей, остается актуальной до настоящего времени. Необходимо учитывать, что изменчивый состав субстанций ХС предполагает некоторые различия в фармакологической активности субстанций от разных производителей [5–7, 25, 26, 46–48, 55–58].

При проверке Союзом потребителей и Мэрилендским университетом в 2010 г. на территории США препаратов ХС оказалось, что только 15 % соответствовали заявленному качеству. Большинство препаратов было изготовлено из ХС низкого качества, где его содержание было значительно ниже 90 % [44]. Исследования 2006 г. рынка биологически активных добавок в Японии обнаружили большой процент несоответствий маркировки препаратов их составу, около 20 % биологически активных добавок из плавников акулы содержали ХС животного происхождения [57].

В 2014 г. американская организация органической химии (АОАС International) опубликовала информацию о том, что в субстанциях ХС были обнаружены примеси каррагинанов, альгинатов, ДС, КС, протеинов, натрия гексаметафосфата и др. [5, 6]. В исследованиях 2015 г. фармацевтических субстанций в Бразилии из 16 образцов ХС только 5 содержало более 90 % ХС, остальные 11 субстанций содержали менее 15 % ХС, оставшуюся часть составляли растительные углеводы, мальтодекстрин и лактоза [7].

На основе литературных и наших экспериментальных данных все примеси, обнаруженные в суб-

станциях ХС, можно подразделить на 3 группы (см. табл. 3).

1. Родственные примеси, или другие представители структурного ряда ГАГ (см. табл. 1, 3). Родственные примеси оказывают влияние на фармакологическую активность субстанции (см. табл. 2). Они попадают при использовании не только разрешенного для производства сырья (трахеи и хрящевые ткани), но и кожи, кишечника и других тканей животных или других видов наземных или морских животных, птиц или рыб.
2. Посторонние примеси технологические или механические. Попадают вследствие использования в производстве ХС сырья низкого качества (несвежее сырье, загрязненное кровью, протеинами, продуктами гниения и т. д.) или из-за недостаточной очистки от побочных продуктов гидролиза и др. Примеси этой группы несут риски возникновения нежелательных и аллергических реакций.
3. Примеси, несвойственные ХС. Чаще всего являются результатом фальсификации продукции с целью удешевления или увеличения объема ХС в продаже, для чего обычно используют дешевые инертные соединения [5–7]. Эта группа примесей приводит к потере фармакологической активности субстанции.

#### Методы стандартизации хондроитина сульфата

Для ХС важным разделом стандартизации является описание требований к исходному сырью, так как состав субстанций ХС непостоянен и во многом зависит от природы сырья.

Известно, что в тканях животных преобладает Х4С, содержание которого составляет около 70 %, а содержание Х6С составляет около 30 %. С возрастом хрящи утончаются и начинает преобладать Х6С [15, 23, 58, 59].

Хрящи акулы и других гидробионтов имеют низкое содержание Х4С (может составлять менее 10 %), при этом содержание Х6С составляет более 80 %, также присутствуют родственные ГАГ, например, содержание КС (см. табл. 1) может составлять до 16 % [18–22, 60].

Стандартизация и требования к составу сырья ХС значительно различаются в разных странах (табл. 4). Если Европейская фармакопея закладывает переменный состав субстанций ХС, разрешая производство из любых хрящевых тканей наземных или морских животных, то согласно требованиям Фармакопеи США субстанция ХС должна иметь стандартизованный состав, в котором соотношение изомерных форм Х4С должно преобладать над Х6С (NLT 1.0), а в производстве разрешено использовать суставные хрящевые ткани домашних животных (крупного рогатого скота,

свиньи и птицы) с обязательным указанием на этикетке, из какого сырья была произведена субстанция [46–48].

На территории России до 1999 г. (согласно требованиям ФС 42-3741-99) в производстве ХС было разрешено использовать только хрящевые ткани и трахеи крупного рогатого скота, выращенного в здоровых хозяйствах, что гарантировало однотипный дисахаридный состав в субстанциях ХС и воспроизводимую фармакологическую активность. В настоящее время в аптечной сети РФ встречается ХС как из наземных животных, так и из гидробионтов.

Действующая система стандартизации лекарственных субстанций и отсутствие открытого доступа к фармакопейным статьям предприятий РФ не дают возможности охарактеризовать официальный подход к стандартизации субстанций ХС. Можно предположить, что для стандартизации ХС на территории РФ используется фармакопейная статья из Европейской фармакопеи (Eur. Ph.), которая разрешает переменный полисахаридный состав субстанции ХС.

### Методы анализа

Из известных нормативных показателей качества при стандартизации ХС, используемых для составления НД [46–48], показатели «Описание», «Растворимость», «рН», «Прозрачность и цветность раствора», содержание азота, серы, белка, хлоридов и сульфатов, тяжелых металлов, остаточных растворителей и др. могут характеризовать ошибки или нарушения процесса производства, включая степень очистки субстанции (определение 2-й группы примесей – технологического или механического характера) (см. табл. 3).

Более сложно при стандартизации субстанций ХС установить соотношение изомеров Х4С и Х6С, присутствие родственных ГАГ (примеси 1-й группы) или других, несвойственных сырью примесей (примеси 3-й группы). Для выявления этих групп примесей используют такие показатели, как «Подлинность», «Удельное вращение», «Вязкость», «Посторонние примеси» (см. табл. 4). Предлагается использовать электрофорез, ВЭЖХ, ИК-, ЯМР-, а в последнее время хромато-энзимный методы анализа.

Таблица 4. Требования к сырью ХС по НД различных стран

| Показатель качества           | Eur. Ph. 7, «Chondroitin sulfate sodium»/Br. Ph. [48]   | USP29, «Chondroitin sulfate sodium» [47]   | ФС 42-3741-99 и статьи РФ НД до 2002 г. «Хондроитин сульфат»   |
|-------------------------------|---|--|--|
| Требования к продукту         | Натриевая соль природного полимера, большей частью состоящего из 2 дисахаридов: 4-сульфат и 6-сульфат. Производят из хрящевых тканей как наземных, так и морских организмов (здоровых и подходящих для потребления). Соотношение Х4С и Х6С может быть различным | Натриевая соль сульфатированных линейных ГАГ, полученных из бычьих, свиных или птичьих суставных хрящевых тканей, от здоровых домашних животных, используемых в пищу людьми. В составе субстанции должен преобладать Х4С | Кислый мукополисахарид, получаемый в виде натриевой соли из трахей крупного рогатого скота   |
| Вязкость                      | Характеристическая вязкость от 0,01 до 0,15 м <sup>3</sup> /кг (капиллярный вискозиметр)  | –  | Характеристическая вязкость не менее 0,2 и не более 0,3 (капиллярный вискозиметр)  |
| Удельное вращение             | От –20 до –30° для наземных организмов (5 % раствор)<br>От –12 до –19° для морских организмов (5 % раствор)   | От –20 до –30° (3 % раствор)   | От –18 до –28° (1 % раствор)   |
| Подлинность                   | А. ИК-спектрометрия<br>В. Качественная реакция на натрий<br>С. Электрофорез (в сравнении с рабочим стандартным образцом (PCO))  | А. ИК-спектрометрия<br>В. Качественная реакция на натрий (предлагается ввести энзимный метод для определения дисахаридного состава: отношение -4S к -6S должно быть не менее 1,0)  | – ИК-спектрометрия<br>– Цветная реакция на уруновые кислоты<br>– Качественная реакция на натрий  |
| Посторонние примеси           | Электрофорез (в сравнении с PCO) – посторонних пятен не больше, чем в PCO (2 %)   | Электрофорез (в сравнении с PCO) – содержание какой-либо посторонней примеси не более 2 %  | –  |
| Метод количественного анализа | Титрование с раствором цетилпиридиния хлорида (ЦПХ)   | Титрование с раствором ЦПХ   | – Спектрофотометрия при 530 нм после гидролиза с карбазолом<br>– Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)<br>– Титрование или спектрофотометрия с ЦПХ |

Определение чистоты субстанций ХС методом электрофореза используют Европейская и Американская фармакопеи, для определения состава ГАГ в субстанциях ХС по USP несколько лет назад было предложено включить хромато-энзимный метод анализа (см. табл. 4).

### Растворимость и вязкость

ХС растворим в воде с набуханием, время которого может составлять от 10–15 мин до 1 ч. Скорость набухания и растворения ХС зависит от ММ полимера, вязкости, наличия в субстанции посторонних примесей, содержания влаги, условий и времени хранения субстанции.

Для растворов полимеров вязкость является функцией ММ, формы, размеров и гибкости макромолекул. Характеристическая вязкость определяет структурную характеристику полимера, для этого приведенную вязкость экстраполируют к нулевой концентрации, и ее значение выражается в единицах, обратных единицам концентрации.

Для определения вязкости ХС рекомендуется использовать капиллярный вискозиметр [48]. Вискозиметрический метод применяется для определения средней ММ молекулы (некоторые частные статьи на ХС декларируют ММ не более 30 000 Да, что гарантирует его биологическую доступность и эффективность в качестве хондропротектора [61]).

### Оптическое вращение

Для субстанций ХС показатель оптического вращения может характеризовать не только присутствие примесей, но и полисахаридный состав [47, 48]. Известно, что ХС, произведенный из хрящей животных (с содержанием изомера Х4С около 50–70 %), имеет показатель оптического вращения  $[\alpha]_{20}/D$  от  $-18...-20^\circ$  до  $-28...-30^\circ$  (см. табл. 4).

ХС, произведенный из акулы и других гидробионтов (с содержанием изомера Х6С до 80 % и с содержанием КС до 16 %), имеет показатель оптического вращения  $[\alpha]_{20}/D$  от  $-12^\circ$  до  $-19^\circ$  (см. табл. 4).

Различные ГАГ могут значительно отличаться по своим оптическим характеристикам, что оказывает влияние на суммарный показатель для готовой субстанции (табл. 5).

### ИК-спектроскопия

С середины прошлого века используется как один из фармакопейных методов подтверждения

подлинности ХС. Сульфогруппы, содержащиеся в структуре ХС, обнаруживают себя в виде полос поглощения при  $850\text{ см}^{-1}$  (Х4С) или  $820\text{ см}^{-1}$  (Х6С), метод дает возможность определения состава и происхождения ХС [26]. Однако наложение полос на практике затрудняет анализ, особенно при содержании примесей до 10–20 %. Для более достоверной идентификации сырья в фармакопейную статью Eur. Ph. от 2017 г. включено использование 2 стандартов для проведения идентификации – ХС животного происхождения и из гидробионтов.

### Электрофорез

Для анализа примесей ХС используют капиллярный электрофорез и электрофорез в геле. Электрофорез обладает высокой селективностью, позволяя определить присутствие ряда примесей 3-й группы, каррагинанов, альгината пропиленгликоля и гексаметафосфата натрия, некоторых примесей 1-й группы (ДС) [6, 7, 63–65]. Метод обладает высокой чувствительностью (определение примесей до 0,1 %) и часто используется в исследовательских работах. Капиллярный электрофорез позволяет провести количественное определение содержания суммы ГАГ в субстанции ХС, при этом присутствие примесей 3-й группы не мешает определению.

Для определения посторонних примесей в фармакопейные статьи Европы и США включен электрофорез (см. табл. 4). Согласно требованиям USP37 электрофорез проводят с использованием буферного раствора ацетата бария (рН 5,0) на целлюлозно-ацетатной пленке [48].

### Энзимный метод анализа

Методика основана на применении специфического фермента (хондроитиназа АС), который может избирательно гидролизовать ХС на олиго- и дисахаридные остатки, при этом другие типы ГАГ не мешают определению. Далее свободные сульфатированные и несulfатированные дисахариды можно количественно определить методом ВЭЖХ или электрофорезом. Методика позволяет по соотношению продуктов распада определить состав и происхождение ХС, обнаружить ХС в сложных смесях с каррагинанами, ДС, глюкозамином. Метод применим к сырью и готовой продукции.

Ферменты, которые используются для деградации ГАГ, принадлежат к семейству полисахаридных

Таблица 5. Оптическое вращение некоторых типов ГАГ

| Показатель качества                    | Х4С                                | Х6С  | ДС   | Гепарин/ГС   |
|--|------------------------------------|--|--|--|
| Оптическое вращение, $[\alpha]_{20}/D$ | От $-20^\circ$ до $-30^\circ$ [62] | От $-10^\circ$ до $-15^\circ$ [62]<br>От $-13^\circ$ до $-18^\circ$ [10] | От $-40^\circ$ до $-70^\circ$ [62]<br>От $-60^\circ$ до $-70^\circ$ [10] | От $+40^\circ$ до $+60^\circ$ [62]<br>От $+38^\circ$ до $+78^\circ$ [10] |

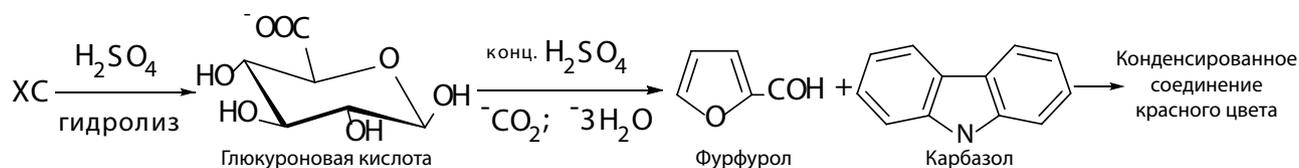


Рис. 2. Цветная реакция с карбазолом



Рис. 3. Реакция с цетилпиридиния хлоридом (ЦПХ)

лиаз, воздействующих на  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) гликозидную связь между остатками гексозамина и уроновых кислот. Ненасыщенные уроновые кислоты имеют высокий показатель поглощения в ультрафиолетовом свете при 232 нм ( $\epsilon = 5500 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ), и эта длина волны используется для количественной оценки продуктов ферментного гидролиза [63–66].

### ЯМР-спектроскопия

ЯМР-спектроскопию используют в исследовательских работах для установления структуры ХС и обнаружения различных примесей. Метод позволил определить присутствие ДС и сверхсульфатированного ХС в субстанциях гепарина. Идентификацию проводили по расположению сигнала протона N-ацетильной группы полисахаридов в области около 1,9–2,5 м. д., которые характеризуют присутствие в сырье контаминантных примесей [6, 31].

Метод ЯМР использовали для определения содержания примеси КС (см. табл. 1) в субстанциях ХС, произведенных из морских животных. При анализе субстанций ХС, произведенных из различных гидробионтов и из хрящей крупного рогатого скота, было обнаружено от 0 до 19 % КС, другая группа исследователей обнаружила до 50 % КС при исследовании субстанций и препаратов ХС [19, 60].

### Количественные методы определения

В НД для количественного определения ХС чаще используются химические методы анализа (см. табл. 4): карбазольный метод и реакция с цетилпиридиния хлоридом (ЦПХ).

**Карбазольный метод** (рис. 2, см. табл. 4, ФС 42-3741-99) включает гидролиз ХС с концентрированной серной кислотой до моносахаров (глюкуроновой кислоты и N-ацетилгалактозамина), далее цветную реакцию остатков глюкуроновой кислоты с карбазолом в присутствии бората с образованием комплекса

красного цвета. Метод не селективен и дает положительный результат с любым ГАГ, а также рядом неорганических солей.

**Метод осаждения с ЦПХ** используется в фармакопейных статьях разных стран мира (рис. 3, см. табл. 4) [47, 48]. Метод основан на способности ХС осаждаться в растворе ЦПХ. Метод не селективен, определению мешают другие типы полианионов.

**ВЭЖХ.** Метод ВЭЖХ чаще используют в исследовательских работах и для количественного анализа ГАГ [30, 66]. Индивидуальное определение родственных ГАГ этим методом затруднительно, для разделения ГАГ предлагались разнообразные варианты проведения анализа – специализированные колонки для определения сахаров, ионообменные полимерные колонки SAX, которые позволили провести определение примесей ДС и сверхсульфатированного ХС в субстанциях гепарина, определить присутствие КС, а также возможное присутствие ДС. Используются различные методы детекции, включая применение детектора светорассеяния (90 LT-ELSD), который позволял провести определение примеси глюкозамина в субстанциях ХС. Предлагалось использовать эксклюзионную жидкостную хроматографию (ситовая хроматография), где разделение основано на ММ.

Метод ВЭЖХ позволяет провести количественный анализ ХС (суммарное содержание родственных ГАГ) в сравнении с внешним стандартом, при этом примеси 2-й и 3-й групп не мешают определению. Метод был включен в ряд частных статей для количественного анализа ХС (см. табл. 4; РФ НД 42-12563-02 ХС, Новая Зеландия).

### Заключение

Анализ НД на препараты ХС показывает необходимость разработки государственного, общепринятого подхода к стандартизации ЛП по аналогии с ФС

других стран и указания на этикетке, из какого сырья была произведена субстанция. Производитель ЛП ХС для подтверждения его фармакологической активности должен контролировать все те аспекты

качества ЛП, которые влияют или могут повлиять на показатели его безопасности и эффективности, включая структурный состав, ММ, наличие возможных примесей.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Volpi N. Quality of different chondroitin sulfate preparations in relation to their therapeutic activity. *J Pharm Pharmacol* 2009;61(10):1271–80. DOI: 10.1211/jpp/61.10.0002. PMID: 19814858.
- Martel-Pelletier J., Farran A., Montell E. et al. Discrepancies in composition and biological effects of different formulations of chondroitin sulfate. *Molecules* 2015;20(3):4277–89. DOI: 10.3390/molecules20034277. PMID: 25756648.
- Шавловская О.А. Обзор зарубежной литературы по применению хондроитина сульфата. *Русский медицинский журнал* 2012;20(34):1678–82. [Shavlovskaya O.A. Foreign literature survey on chondroitin sulfate use. *Russky meditsinsky zhurnal = Russian Medical Journal* 2012;20(34):1678–82. (In Russ.)].
- Хубиева А.Ю. Фармакокинетические исследования различных лекарственных форм хондроитина сульфата. Дис. ... канд. фарм. наук. М., 2007. [Hubieva A.Yu. Pharmacokinetic studies of different medical forms of chondroitin sulfate. Thesis ... of candidate of pharmaceutical sciences. Moscow, 2007. (In Russ.)].
- Working Group on Chondroitin Sulfate. AOAC Mid-Year Meeting March 21, 2014. Maryland, USA.
- Weiguo Z., Giancaspro G., Adams K.M. et al. Electrophoretic separation of alginic sodium diester and sodium hexametaphosphate in chondroitin sulfate that interfere with the cetylpyridinium chloride titration. *J AOAC Int* 2014;97(6):1503–13. DOI: 10.5740/jaoacint.14-167. PMID: 25372663.
- da Cunha A.L., de Oliveira L.G., Maia L.F. et al. Pharmaceutical grade chondroitin sulfate: Structural analysis and identification of contaminants in different commercial preparations. *Carbohydr Polym* 2015;134:300–8. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.08.006. PMID: 26428128.
- Васильев А.Н., Реутская Л.А., Байдулаева Ш.А. и др. Качество лекарственных препаратов. Суть вопроса и зарубежный опыт. *Ремедиум* 2014;(10):14–27. [Vasiliev A.N., Reutskaya L.A., Baidulaeva Sh.A. et al. Quality of medicinal products. The crux of the problem and foreign experience. *Remedium* 2014;(10):14–27. (In Russ.)]. DOI: 10.21518/1561-5936-2014-10-14-24.
- Стейси М., Баркер С. Углеводы живых тканей. Пер. с англ. М., 1965. [Stacey M., Barker S. Carbohydrates of living tissues. Transl. from Engl. M., 1965. (In Russ.)].
- The carbohydrates: chemistry and biochemistry. 2<sup>nd</sup> edn. Vol. IIB. Ed. by W.W. Pigman, D. Horton. Academic Press, 1970. 452 p. DOI: 10.1016/B978-0-12-556352-9.X5001-X.
- Textbook of biochemistry with clinical correlations (6<sup>th</sup> edn.). Ed. by T.M. Devlin. Hoboken, New Jersey: Wiley-Liss, 2006. 1208 p. DOI: 10.1002/bmb.2006.49403403236.
- Северин Е.С. Биохимия. М.: Гэотар-Мед, 2003. 779 с. [Severin E.S. Biochemistry. Moscow: Geotar-Med, 2003. 779 p. (In Russ.)].
- Meyer K., Linker A., Davidson E.A., Weissmann B. The mucopolysaccharides of bovine cornea. *J Biol Chem* 1953;205(2):611–6. PMID: 13129238.
- Касавина Б.С., Кольчинский Т.А., Зенкевич Г.Д. Мукополисахариды костной и хрящевой ткани в норме и патологии. *Успехи современной биологии* 1970;69(3):353–63. [Kasavina B.S., Kolchinskiy T.A., Zenkevich G.D. The mucopolysaccharides of bone and cartilage tissue normal and pathological. *Uspekhi sovremennoy biologii = Successes of Modern Biology* 1970;69(3):353–63. (In Russ.)].
- Lindahl U., Couchman J., Kimata K., Esko J.D. Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans. In: *Essentials of glycobiology*. 3<sup>rd</sup> edn. Ed. by A. Varki et al. Cold Spring Harbor Press, 2015–2017. DOI: 10.1101/glycobiology.3e.017.
- Понеделькина И.Ю., Лукина Е.С., Одинокоев В.Н. Кислые гликозаминогликаны и их химическая модификация. *Биоорганическая химия* 2008;34(1):5–28. [Ponedelkina I.Yu., Lukina E.S., Odinokov V.N. Acid glycosaminoglycans and their chemical modification. *Bioorganicheskaya khimiya = Bioorganic Chemistry* 2008;34(1):5–28. (In Russ.)].
- Хабаров В.Н., Бойков П.Я., Селянин М.А. Гиалуроновая кислота: получение, свойства, применение в биологии и медицине. М.: Практическая медицина, 2012. 224 с. [Khabarov V.N., Boykov P.Ya., Selyanin M.A. Hyaluronic acid: getting, properties, use in biology and medicine. Moscow: Practical Medicine, 2012. 224 p. (In Russ.)].
- Funderburgh J.L. Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology* 2000;10(10):951–8. PMID: 11030741.
- Restaino O.F., Finamore R., Diana P. et al. A multi-analytical approach to better assess the keratan sulfate contamination in animal origin chondroitin sulfate. *Anal Chimica Acta* 2017;958:59–70. DOI: 10.1016/j.aca.2016.12.005. PMID: 28110685.
- Uchimura K. Keratan sulfate: biosynthesis, structures, and biological functions. *Methods Mol Biol* 2015;1229:389–400. DOI: 10.1007/978-1-4939-1714-3\_30. PMID: 25325967.
- Shang Q., Li Q., Zhang M. et al. Dietary keratan sulfate from shark cartilage modulates gut microbiota and increases the abundance of *Lactobacillus* spp. *Mar Drugs* 2016;14(12):224. DOI: 10.3390/md14120224. PMID: 27941632.
- Greiling H. Structure and biological functions of keratan sulfate proteoglycans. *EXS* 1994;70:101–22. PMID: 8298243.
- Rodén L., Armand G. Structure of the chondroitin 4-sulfate-protein linkage region. Isolation and characterization of the disaccharide 3-O-beta-D-glucuronosyl-D-galactose. *J Biol Chem* 1966;241(1):65–70. PMID: 4285135.
- Lamari F.N., Karamanos N.K. Structure of chondroitin sulfate. *Adv Pharmacol* 2006;53:33–48. DOI: 10.1016/S1054-3589(05)53003-5. PMID: 17239761.
- Шкарина Т.Н., Лутцева А.И., Ковалева С.В. и др. Лекарственные средства, содержащие хондроитин сульфат. *Фармация* 2007;(3):42–8. [Shkarina T.N., Lutzeva A.I., Kovaleva S.V. et al.

- Kovaleva S.V. et al. Drugs possessing chondroitin sulfate. *Farmatsiya = Farmacia* 2007;(3):42–8. (In Russ.).
26. Шкарина Т.Н. Анализ и стандартизация хондроитина сульфата натрия. Дис. ... канд. фарм. наук. М., 2009. [Shkarina T.N. Analysis and standardization of sodium sulfate chondroitin. Thesis ... of candidate of pharmaceutical sciences. Moscow, 2009. (In Russ.).]
  27. Seno N., Murakami K. Structure of disulfated disaccharides from chondroitin polysulfates, chondroitin sulfate D and K. *Carbohydr Res* 1982;103:190–4. DOI: 10.1016/S0008-6215(82)80024-4.
  28. Takagaki K., Munakata H., Kakizaki I. et al. Domain structure of chondroitin sulfate E octasaccharides binding to type V collagen. *J Biol Chem* 2002;277(11):8882–9. DOI: 10.1074/jbc.M106479200. PMID: 11751896.
  29. Ueoka C., Nadanaka S., Seno N. et al. Structural determination of novel tetra- and hexasaccharide sequences isolated from chondroitin sulfate H (oversulfated dermatan sulfate) of hagfish notochord. *Glycoconj J* 1999;16(6):291–305. PMID: 10579698.
  30. Kavitha G., Nadamuni G., Venkatesan C.S. et al. A pH-gradient HPLC method for determination of trace levels of over sulfated chondroitin sulfate and dermatan sulfate in heparin sodium. *IJPSR* 2014;5(11):4916–24. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.5(11).4916-24.
  31. Huckerby T.N., Nieduszynski I., Giannopoulos M. et al. Characterization of oligosaccharides from the chondroitin dermatan sulfates 1H-NMR and 13C-NMR studies of reduced trisaccharides and hexasaccharides. *FEBS J* 2005;272(24):6276–86. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.05009.x. PMID: 16336265.
  32. Fransson L.A., Rodén L. Structure of dermatan sulfate. II. Characterization of products obtained by hyaluronidase digestion of dermatan sulfate. *J Biol Chem* 1967;242(18):4170–5. PMID: 4228842.
  33. *Biology of brain dysfunction. Vol. I.* Ed. by G.E. Gaull. New York/London: Plenum Press, 1973. 403 p. DOI:10.1007/978-1-4684-2667-0.
  34. Shriver Z., Capila I., Venkataraman G., Sasisekharan R. Heparin and heparan sulfate: analyzing structure and microheterogeneity. *Handb Exp Pharmacol* 2012;(207):159–76. DOI: 10.1007/978-3-642-23056-1\_8. PMID: 22566225.
  35. Новиков В.Е. Хондропротекторы. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии 2010;8(4):41–7. [Novikov V.E. Chondroprotectors. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii = Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy* 2010;8(4):41–7. (In Russ.).]
  36. Lemaire P.A., Huang L., Zhuo Ya et al. Chondroitin sulfate promotes activation of cathepsin K. *J Biol Chem* 2014;289(31):21562–72. DOI: 10.1074/jbc.M114.559898. PMID: 24958728.
  37. Damlar I., Esen E., Tatli U. Effects of glucosamine-chondroitin combination on synovial fluid IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and PGE2 levels in internal derangements of temporomandibular joint. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2015;20(3):e278–83. PMID: 25662545.
  38. Лазебник Л.Б., Дроздов В.Н. Эффективность хондроитин сульфата при лечении гонартроза и коксартроза у больных пожилого возраста. *Терапевтический архив* 2005;(8):64–9. [Lazebnik L.B., Drozdov V.N. The effectiveness of chondroitin sulfate in treating gonarthrosis and coxarthrosis of elderly patients. *Terapevtichesky arkhiv = Therapeutic Archive* 2005;(8):64–9. (In Russ.).]
  39. Ермакова И.И. Протеогликаны культуры миобластов L6J1: характеристика и влияние на адгезию, пролиферацию и дифференцировку миобластов. Дис. ... канд. фарм. наук. Санкт-Петербург, 2008. [Ermakova I.I. L6J1 Myoblast culture proteoglycans: characteristics and effects on adhesion, proliferation and differentiation of myoblasts. Thesis ... of candidate of pharmaceutical sciences. St. Petersburg, 2008. (In Russ.).]
  40. Сигаева Н.Н., Колесов С.В., Назаров П.В., Вильданова Р.Р. Химическая модификация гиалуриновой кислоты и ее применение в медицине. *Вестник Башкирского университета* 2012;17(3):1221–2. [Sigaeva N.N., Kolesov S.V., Nazarov P.V., Vildanova R.R. Chemical Modification of hyaluronic acid and its use in medicine. *Vestnik Bashkirskego universiteta = Bulletin of Bashkir University* 2012;17(3):1221–2. (In Russ.).]
  41. da Cunha A.L., Aguiar J.A.K., Correa da Silva F.S., Michelacci Y.M. Do chondroitin sulfates with different structures have different activities on chondrocytes and macrophages? *Int J Biol Macromol* 2017;103:1019–31. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.123. PMID: 28536017.
  42. Liu S., Shen J.R., Yu R.M. Extraction and antihypertensive activity analysis of chondroitin sulfate from different animals. *Zhong Yao Cai* 2010;33(2):180–3. PMID: 20575407.
  43. Nakazawa K., Murata K. Comparative study of the effects of chondroitin sulfate isomers on atherosclerotic subjects. *Z Alternersforsch* 1979;34(2):153–9. PMID: 395771.
  44. Adebawale A.O., Cox D.S., Liang Z., Eddington N.D. Analysis of glucosamine and chondroitin sulfate content in marketed products and the Caco-2 permeability of chondroitin sulfate raw materials. *J Am Nutr Assoc* 2000;(3):37–44.
  45. Toida T., Sakai S., Akiyama H., Linhardt R.J. Immunological activity of chondroitin sulfate. *Adv Pharmacol* 2006;53:403–15. DOI: 10.1016/S1054-3589(05)53019-9. PMID: 17239777.
  46. Volpi N. Analytical aspects of pharmaceutical grade chondroitin sulfates. *J Pharm Sci* 2007;96(12):3168–80. DOI: 10.1002/jps.20997. PMID: 17630645.
  47. Chondroitin sulfate sodium. U.S. Pharmacopeia Monograph, USP 32–NF27:980.
  48. Chondroitin sulfate sodium. European Pharmacopeia Monographs, EP 7,0: 1681–1683.
  49. Shin S.C., You S.J., An B.K., Kang C.W. Study on extraction of mucopolysaccharide-protein containing chondroitin sulfate from chicken keel cartilage. *Asian-Australas J Anim Sci* 2006;19(4):601–4. DOI: 10.5713/ajas.2006.601.
  50. Srichamroen A., Nakano T., Pietrasik Z. et al. Chondroitin sulfate extraction from broiler chicken cartilage by tissue autolysis. *Food Sci Technol* 2013;50(2):607–12. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.07.039.
  51. Maccari F., Galeotti F., Volpi N. Isolation and structural characterization of chondroitin sulfate from bony fishes. *Carbohydr Polym* 2015;129:143–7. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.04.059. PMID: 26050899.
  52. Порцель М.Н. Разработка технологии получения хондроитин сульфата из гидробионтов Баренцева моря и изучение его физико-химических свойств. Дис. ... канд. фарм. наук. Мурманск, 2011. [Portsel M.N. Technology development of obtaining chondroitin sulfate from hydrobionts of the Barents sea and the study of its physical-chemical properties. Thesis ... of candidate of pharmaceutical sciences. Murmansk, 2011. (In Russ.).]
  53. Кучина Ю.А., Новиков В.Ю., Деркач С.Р. и др. Свойства хондроитина сульфата из морских гидробионтов. X Всероссийская научная конференция и школа молодых ученых

- «Химия и технология растительных веществ» (Казань, 2017): тезисы докладов. Казань: ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, 2017. С. 61–2. [Kuchina Yu.A., Novikov V.Yu., Derkach S.R. et al. Properties of chondroitin sulfate from marine hydrobionts. X All-Russian Scientific Conference and School of Young Scientists “Chemistry and Technology of Plant Substances” (Kazan, 2017): Abstracts. Kazan: IOFH them. A.E. Arbuzov KazSC RAS, 2017. Pp. 61–2. (In Russ.)].
54. Nakano T., Ikawa N., Ozimek L. An economical method to extract chondroitin sulphate-peptide from bovine nasal cartilage. *Canadian Agricultural Engineering* 2000;42(4):205–8.
55. Письмо № ОЗИ-578/08 от 08.09.2008 г. О контроле качества посторонних примесей в препаратах гепарина. Минздравсоцразвития РФ, Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения и социального развития. [Letter No. OZI-578/08 from 8.09.2008. On quality control of extraneous impurities in heparin drugs. Ministry of Health and Social Development of Russia, The Federal service for supervision in the health and social development sphere. (In Russ.)].
56. Chess E.K., Bairstow S., Donovan S. et al. Case study: contamination of heparin with oversulfated chondroitin sulfate. *Handb Exp Pharmacol* 2012;(207):99–125. DOI: 10.1007/978-3-642-23056-1\_6. PMID: 22566223.
57. Sakai S., Otake E., Toida T., Goda Y. Identification of the origin of chondroitin sulfate in “health foods”. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2007;55(2):299–303. PMID: 17268105.
58. Bertolotto A., Palmucci L., Mongini T. et al. Chondroitin, chondroitin 6-sulphate, chondroitin 4-sulphate and dermatan sulphate proteoglycans in normal and pathological human muscle. *J Neurol Sci* 1987;81(2–3):247–59. PMID: 3694231.
59. Worrall J.G., Wilkinson L.S., Bayliss M.T., Edwards J.C. Zonal distribution of chondroitin-4-sulphate/dermatan sulphate and chondroitin-6-sulphate in normal and diseased human synovium. *Ann Rheum Dis* 1994;53(1):35–8. PMID: 8311553.
60. Pomin V.H., Piquet A.A., Pereira M.S., Mourão P.A. Residual keratan sulfate in chondroitin sulfate formulations for oral administration. *Carbohydr Polym* 2012;90(2):839–46. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.06.009. PMID: 22840010.
61. Adebawale A.O., Du J., Liang Z. et al. The bioavailability and pharmacokinetics of glucosamine hydrochloride and low molecular weight chondroitin sulfate after single and multiple doses to beagle dogs. *Biopharm Drug Dispos* 2002;23(6):217–25. DOI: 10.1002/bdd.315. PMID: 12214321.
62. Concise polymeric materials encyclopedia. Ed. by J.C. Salamone. CRC Press, Technology & Engineering, 1998. 1760 p.
63. Ucakturk E., Cai C., Li L. et al. Capillary electrophoresis for total glycosaminoglycan analysis. *Anal Bioanal Chem* 2014;406(19):4617–26. DOI: 10.1007/s00216-014-7859-8. PMID: 24817364.
64. Vaclavikova E., Kvasnicka F. Quality control of chondroitin sulphate used in dietary supplements. *Czech J Food Sci* 2015;33:165–73. DOI: 10.17221/326/2014-CJFS.
65. Capillary electrophoresis: theory and practice. 2nd edn. Ed. by P. Camilleri. CRC Press, 1997. 576 p.
66. Ji D., Roman M., Zhou J., Hildreth J. Determination of chondroitin sulfate content in raw materials and dietary supplements by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection after enzymatic hydrolysis: single-laboratory validation. *J AOAC Int* 2007;90(3):659–69. PMID: 17580617.

#### ORCID авторов/ORCID of authors

Е.Л. Комарова/E.L. Komarova: <https://orcid.org/0000-0002-1204-8234>  
 С.В. Чернова/S.V. Chernova: <https://orcid.org/0000-0001-5181-4547>  
 Л.В. Овсянникова/L.V. Ovsyannikova: <https://orcid.org/0000-0002-0566-3079>  
 К.И. Эллер/K.I. Eller: <https://orcid.org/0000-0003-1046-4442>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

# ОБНАРУЖЕНИЕ ОНКОГЕНА E7 ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 18-ГО ТИПА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Г.М. Волгарева, В.Д. Ермилова

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

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

**Введение.** Высокие показатели заболеваемости раком предстательной железы (РПЖ) свидетельствуют о важности изучения природы данного заболевания и поиска путей его профилактики. Вопрос об участии онкогенных вирусов папилломы человека (ВПЧ) в генезе РПЖ остается предметом дискуссий. В случае подтверждения факта ассоциации РПЖ с ВПЧ станет возможным предупреждение этого заболевания путем прививок мальчиков вакцинами, разработанными для профилактики рака шейки матки (РШМ).

**Цель работы** — продолжая начатое исследование, изучить хирургически удаленные у больных РПЖ ткани предстательной железы на предмет присутствия в них онкогена E7 ВПЧ18, 2-го по частоте типа ВПЧ, ответственного за возникновение РШМ.

**Материалы и методы.** Работа проведена на предстательных железах 17 больных РПЖ, получивших хирургическое лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Методом полимеразной цепной реакции провели детекцию онкогена E7 ВПЧ18. Для повышения чувствительности метода ДНК выделяли из однородных клеточных популяций, полученных путем микродиссекции криоконсервированных образцов РПЖ.

**Результаты.** Продукты амплификации, соответствующие онкогену E7 ВПЧ18, обнаружены в образцах от 2 больных РПЖ. **Заключение.** Онкоген E7 ВПЧ18 обнаружен в тканях предстательных желез, удаленных у больных РПЖ, в 2 случаях из 17. В совокупности с ранее полученными нами данными (7 ВПЧ16-положительных случаев РПЖ в той же выборке из 17 пациентов) этот результат позволяет предполагать участие онкогенных ВПЧ в генезе РПЖ. Проблема заслуживает дальнейшего изучения.

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

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-37-41

## DETECTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 18 ONCOGEN E7 IN PATIENTS WITH PROSTATE CANCER

G.M. Volgareva, V.D. Ermilova

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

**Introduction.** High prostate cancer (PC) incidence rates testify to importance of research into genesis of the given disease and means of its prevention. The item of oncogenic human papillomaviruses (HPVs) participation in PC origination is still being the subject of debates. If association of PC with HPV is proven prophylaxis of the given disease becomes possible by means of inoculating boys with the vaccines made for cervical cancer (CC) prevention.

**Objective:** to test whether prostate tissues surgically removed from PC patients harbor oncogen E7 of HPV18 — the second most common HPV type responsible for CC.

**Materials and methods.** The study was carried out on prostate glands of 17 PC patients surgically treated in N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. Detection of HPV18 oncogen E7 was done by polymerase chain reaction. To elevate polymerase chain reaction sensitivity DNA was isolated from homogeneous cell populations collected by means of microdissections from cryopreserved PC specimens.

**Results.** Amplification products corresponding to HPV18 oncogen E7 were registered in tests from 2 PC patients.

**Conclusion.** HPV18 oncogen E7 was detected in surgically removed prostate tissues of 2 PC patients. In the aggregate with our previous result (7 HPV16-positive PC cases in the same group of 17 patients) the given result enables one to presume participation of oncogenic HPVs in PC genesis. The problem deserves further study.

**Key words:** prostate gland, cancer, human papillomaviruses, prevention

### Введение

Вирусы папилломы человека (ВПЧ) типов высокого онкогенного риска являются этиологическими агентами рака шейки матки (РШМ), а также определенной части карцином иных локализаций — аногенитальной сферы, головы и шеи. В отношении некоторых других распространенных онкологических заболеваний, в частности рака легкого, мочевого пузыря, молочной железы (у женщин), предстательной железы (у мужчин), вопрос об ассоциации их с онкогенными ВПЧ остается дискутабельным («inadequate evidence») [1].

Что касается механизмов ВПЧ-индуцированного канцерогенеза, то «золотым стандартом» в исследованиях, посвященных этой проблеме, остаются клинические образцы РШМ, а также клетки длительно пересеваемых *in vitro* линий, полученных из этих опухолей; установлено, что для злокачественного превращения эпителиальной клетки под действием онкогенных ВПЧ необходима длительная вирусная инфекция, а также экспрессия вирусных онкогенов *E6* и *E7*, инактивирующих важнейшие белки клетки-хозяина, в том числе супрессоры опухолевого роста *p53* и *Rb*, с которыми взаимодействуют соответственно белки *E6* и *E7* [2, 3]. Среди ВПЧ типов высокого онкогенного риска основными являются ВПЧ16 — причина более чем половины всех случаев РШМ в мире, а также ВПЧ18 — этиологический агент приблизительно каждого 5-го случая РШМ [3].

Заболеемость раком предстательной железы (РПЖ) занимает 2-е место среди злокачественных опухолей у мужчин, хотя между разными странами мира частота РПЖ различается в 30 раз, а смертность от него — в 18 раз [4]. В тех странах, где большинство жителей отказались от курения, РПЖ стал обгонять по частоте рак легкого [5]. В России риск для мужчин заболеть РПЖ в период с 2010 по 2015 г. увеличился на 36,8 %; данный показатель оказался наивысшим среди всех аналогичных показателей прироста числа вновь выявленных заболеваний мужчин злокачественными новообразованиями за этот период [6]. Исчерпывающего понимания причин возникновения РПЖ на сегодня нет; проблема возможной ассоциации этой формы рака с онкогенными ВПЧ оказалась весьма сложной [7]. Актуальность изучения роли ВПЧ в генезе РПЖ высока: помимо теоретического аспекта (прояснения природы распространенной формы рака), в практическом плане в случае подтверждения существования такой ассоциации откроется перспектива профилактики РПЖ путем прививок мальчиков вакцинами, созданными для предупреждения РШМ. Ранее мы сообщили об обнаружении онкогена *E7* ВПЧ16 в 7 из 17 проанализированных образцов тканей предстательной железы, удаленных у больных РПЖ [8].

**Цель настоящей работы** — продолжая начатое исследование, изучить хирургически удаленные у больных РПЖ ткани предстательной железы на предмет присутствия в них онкогена *E7* ВПЧ18, 2-го по частоте типа ВПЧ, ответственного за возникновение РШМ.

Как и в случае с обнаружением *E7* ВПЧ16, для достижения этой цели предстояло учесть характерный для РПЖ мультицентрический рост опухоли. Априори это ставило под сомнение эффективность использования в полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК, выделенной из предстательной железы больного РПЖ без предварительного вычленения из органа зон раковых клеток. Поэтому предпочтение было отдано методу микродиссекций препаратов РПЖ с последующим выделением ДНК из полученных однородных клеточных суспензий. Для большей сохранности ДНК, что представлялось важным на случай присутствия в исследуемых тканях геномов ВПЧ в малом количестве копий, использовали криоконсервированные, не подвергавшиеся обработке формалином и парафином, ткани предстательных желез.

### Материалы и методы

В работе были использованы лизаты тканей предстательных желез, удаленных при радикальной простатэктомии у 17 больных РПЖ, проходивших лечение в урологическом отделении ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Получение этих лизатов мы описали ранее [8]. Основные этапы процедуры были таковы. Патологически измененные области железы морфолог выделял при вырезке макроскопически. Не позднее 2 ч с момента хирургической операции фрагмент ткани с макроскопически выявленной патологией помещали в морозильную камеру (–70 °С). Далее готовили криостатные срезы, на которых проводили микродиссекции с параллельным микроскопическим анализом материала (для чего готовили специальный окрашенный препарат); из однородных клеточных суспензий, полученных в ходе микродиссекций, с помощью протеиназы К («Хеликон», Россия) выделяли ДНК.

Возраст больных, значения простатспецифического антигена в сыворотке крови, индекс Глисона, а также стадия опухоли по системе TNM представлены во 2–5-й графах таблицы. Эти данные, а также результаты гистологического исследования клинических материалов (см. таблицу, 6-я и 7-я графы) мы подробнее представили в предыдущем сообщении [8]. Присутствие в клеточных лизатах генетического материала ВПЧ18 проверяли методом ПЦР со следующими праймерами к *E7*: прямым (5'-GCTGAACCA CAACGTCAG AC-3') и обратным (5'-GGTCGTCTG CTGAGCTTTCT-3'). Праймеры были синтезированы в компании «Литех» (Россия). Длина продукта

Данные о больных РПЖ и результаты детекции онкогена *E7 ВПЧ18* в тканях удаленных у них предстательных желез

| №   | Возраст, лет | Стадия TNM | Уровень простат-специфического антигена в сыворотке крови, нг/мл | Индекс Глисона в материале предоперационной биопсии | Гистологическое заключение об операционном материале      | Гистологическое заключение о криостатном препарате, из которого выделяли ДНК | Результат детекции онкогена <i>E7 ВПЧ18</i> |
|-----|--------------|------------|--|---|---|--|---|
| 1*  | 52           | T2N0M0     | 5,9  | 7   | Мелкоацинарный рак  | ПИН I<br>ПИН III   | —<br>—                                      |
| 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  | —   |

**Примечание.** ПИН – простатическая интраэпителиальная неоплазия; \**E7 ВПЧ16*–положительные случаи, согласно ранее полученным данным [8].

амплификации составляла 88 п. о. Состав реакционной смеси не отличался от ранее описанного [8]. Режим реакции был следующим: 94 °С – 4 мин, далее 35 циклов из 3 этапов: 94 °С – 30 с, 58 °С – 30 с, 72 °С – 90 с; заключительная элонгация при 72 °С – 6 мин.

При постановке ПЦР положительным контролем служила ДНК из клеток ВПЧ18-положительной линии HeLa РШМ (American Type Culture Collection, США); отрицательным контролем была реакционная смесь для ПЦР, не содержащая ДНК. Результаты учитывали при получении адекватных данных в положительном и отрицательном контролях.

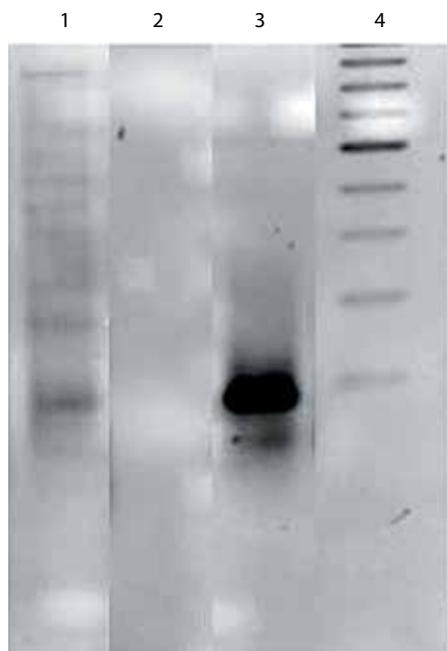
### Результаты и обсуждение

При гистологическом исследовании операционного материала (см. таблицу, 6-я графа) наличие ра-

ковой опухоли в предстательной железе было подтверждено для 16 из 17 больных; при этом на препарате, на котором проводили микродиссекцию, раковые клетки были обнаружены в 5 случаях (см. таблицу, 7-я графа).

С помощью ПЦР присутствие ДНК *E7 ВПЧ18* было обнаружено в лизатах клеток тяжелых дисплазий предстательной железы (ПИН III) от 2 из 17 обследованных больных (см. таблицу, 8-я графа; рисунок). Ранее мы сообщали о выявлении онкогена *E7 ВПЧ16* в клеточных лизатах, полученных из предстательных желез 7 обследованных больных РПЖ [8]. Эти случаи в настоящей работе отмечены знаком «\*» в 1-й графе таблицы.

В 5 из 17 изученных нами случаев РПЖ размер препарата, с которого проводили микродиссекции,



Электрофореграмма ПЦР-продуктов. Целевой продукт амплификации, соответствующий *E7* ВПЧ18 (88 п. н.), – в 1-м и 3-м треках. Трек 1 – больной № 2, ПИН III; трек 2 – отрицательный контроль (реакционная смесь без ДНК); трек 3 – ДНК HeLa (положительный контроль); трек 4 – маркер длин продуктов амплификации, шаг – 100 п. н.

оказался достаточным для того, чтобы отобрать клетки «условной нормы». Это были препараты от больных № 1, 2, 6, 8 и 10. Помимо отмеченного морфологом патологически измененного участка, с которого были выделены клетки ПИН I и ПИН III (больной № 1), ПИН III (больной № 2) или карциномы (больные № 6, 8 и 10), представилось также возможным отобрать клетки с участка препарата без микроскопически видимой патологии. Получив из этих зон клеточные лизаты, мы протестировали их в ПЦР с праймерами к *E7* ВПЧ16 (в соответствии с ранее описанной процедурой [8]) и ВПЧ18; во всех случаях результаты тестов оказались отрицательными. При этом в патологически измененных клетках у тех же больных результаты теста на *E7* ВПЧ16 или *E7* ВПЧ18 оказались положительными (см. таблицу).

В целом онкоген *E7* ВПЧ16 и ВПЧ18, 2 основных типов ВПЧ, являющихся этиологическими агентами РШМ, мы обнаружили в клетках дисплазий и карцином хирургически удаленных предстательных желез 9 из 17 больных РПЖ. У 5 из 9 ВПЧ-положительных больных, у которых представилось возможным протестировать условно нормальные клетки предстательной железы, результаты тестов оказались отрицательными.

Вопрос о вовлеченности онкогенных ВПЧ в генез РПЖ остается дискуссионным. Различаются как публикуемые разными авторами результаты детекции

генетического материала ВПЧ в клинических образцах РПЖ, так и интерпретация этих результатов [9–11]. Все известные нам работы, в которых предпринимались подобные попытки, были выполнены на фиксированных формалином, заключенных в парафин тканях, из которых после депарафинирования выделялась тотальная ДНК, т. е. накопление раковых клеток, которое достигается при микродиссекции, не проводилось. Отдельного упоминания заслуживает недавняя публикация группы австралийских исследователей, сопоставивших частоты ВПЧ-положительных дисплазий предстательной железы с частотами ВПЧ-положительных случаев РПЖ, развившегося у тех же мужчин через промежуток времени от 1 года до 10 лет после выявления у них дисплазии [11]. Оказалось, что онкоген *E7* ВПЧ типов высокого риска в ПЦР обнаруживался в дисплазиях достоверно чаще, чем в карциномах; этот результат авторы подтвердили в иммуногистохимическом тесте с антителами к белку *E7* широкого спектра онкогенных ВПЧ: экспрессия онкобелка *E7* составила 82 % в дисплазиях и 29 % в карциномах. На основании этих наблюдений авторы пришли к заключению, что активность онкогенов ВПЧ типов высокого риска является ранним событием в генезе большей части случаев РПЖ и что онкогенные ВПЧ имеют отношение к этиологии данной формы рака.

Таким образом, на группе российских больных РПЖ нами получены результаты, которые свидетельствуют о возможном вовлечении 2 основных типов онкогенных ВПЧ, ответственных за развитие РШМ, в генез РПЖ. В работе впервые использованы криоконсервированные, не подвергавшиеся обработке формалином и парафином, образцы опухолей, что способствовало лучшей сохранности ДНК.

### Заключение

Онкоген *E7* ВПЧ18 обнаружен в тканях удаленных у больных РПЖ предстательных желез в 2 случаях из 17. В совокупности с ранее полученными нами данными (7 *E7* ВПЧ16-положительных случаев РПЖ в той же выборке из 17 больных) этот результат позволяет предполагать, что ВПЧ16 и ВПЧ18, основные типы ВПЧ, ответственные за развитие РШМ, нередко присутствуют в предстательных железах российских больных РПЖ. Впервые при исследовании возможности ассоциации РПЖ с ВПЧ нами применен метод микродиссекций криостатных срезов предстательной железы, что позволило обеспечить большую сохранность ДНК и выделять ее из однородных клеточных популяций. Представленные данные важны для выяснения этиологии и разработки мер профилактики РПЖ. Проблема возможной ассоциации РПЖ с ВПЧ типов высокого онкогенного риска заслуживает дальнейшего изучения.

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

1. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 90. Human Papillomaviruses. Lyon, 2007. 689 p.
2. 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.
3. zur Hausen H. To vaccination and beyond. *Biochemistry (Moscow)* 2008;73(5):498–503. PMID: 18605974.
4. 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.
5. Имянитов Е.Н. Эпидемиология и биология рака простаты. *Практическая онкология* 2008;(2):57–64. [Imyanitov E.N. Prostate cancer epidemiology and biology. *Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology* 2008;(2):57–64. (In Russ.)].
6. Давыдов М.М., Аксель Е.М. Стандартизованные показатели онкоэпидемиологической ситуации 2015 г. Россия. *Евразийский онкологический журнал* 2017;5(2):298–317. [Davydov M.M., Aksel E.M. Normalized indices of oncoepidemiologic situation in 2015 in Russia. *Evraziysky onkologichesky zhurnal = Eurasian Oncologic Journal* 2017;5(2):298–317. (In Russ.)].
7. Волгарева Г.М. Ассоциирован ли рак предстательной железы с вирусами папилломы человека? *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(2):6–12. [Vlgareva G.M. Is there an association between prostate cancer and human papillomaviruses? *Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(2):6–12. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-6-12.
8. Волгарева Г.М., Ермилова В.Д., Хачатурян А.В. и др. Обнаружение онкогена *E7* вируса папилломы человека 16-го типа в операционном материале от российских больных раком предстательной железы. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(3):59–62. [Vlgareva G.M., Ermilova V.D., Khachatryan A.V. et al. Detection of Human papillomavirus type 16 oncogen *E7* in surgical materials from Russian prostate cancer patients. *Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(3):59–62. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-59-62.
9. Aghakhani A., Hamkar R., Parvin M. et al. The role of human papillomavirus infection in prostate carcinoma. *Scand J Infect Dis* 2011;43(1):64–9. DOI: 10.3109/00365548.2010.502904. PMID: 20662618.
10. Smelov V., van Moorselaar J., Startsev V. et al. No high-risk human papillomavirus infection in prostate cancer tissues. *Scand J Infect Dis* 2011;43(5):399–400. DOI: 10.3109/00365548.2011.552071. PMID: 21250904.
11. Glenn W.K., Ngan C.C., Amos T.G. et al. High risk human papilloma viruses (HPVs) are present in benign prostate tissues before development of HPV associated prostate cancer. *Infect Agent Cancer* 2017;12:46. DOI: 10.1186/s13027-017-0157-2. PMID: 28811834.

**ORCID авторов/ORCID of authors**

Г.М. Волгарева/G.M. Volgareva: <https://orcid.org/0000-0002-6817-2103>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

# ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ IGF-1 – НЕБЛАГОПРИЯТНЫЙ ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ ФАКТОР ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

С.С. Шушанов<sup>1</sup>, Т.А. Кравцова<sup>1</sup>, А.В. Вайман<sup>1</sup>, Н.П. Акентьева<sup>2</sup>, Ю.Б. Черных<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт проблем химической физики РАН»; Россия, 142432 Московская обл., Черноголовка, пр-т Академика Семенова, 1;

<sup>3</sup>ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; Россия, 129110 Москва, ул. Щепкина, 61/2

**Контакты:** Саин Саеневич Шушанов [sainHershy@yandex.ru](mailto:sainHershy@yandex.ru)

**Введение.** Инсулиноподобные факторы роста (IGF) являются одними из широко изучаемых факторов в онкологии. Для опухолей с высоким уровнем экспрессии IGF характерен послеоперационный рецидив, они являются инвазивными и дают отдаленные метастазы. Также имеются данные об участии IGF в возникновении резистентности к противоопухолевым препаратам. Механизмы, определяющие влияние IGF на прогрессию ряда злокачественных новообразований, остаются нераскрытыми, и проведение фундаментальных исследований в этом направлении является актуальным.

**Цель исследования** – изучить роль IGF 1-го типа (IGF-1) при множественной миеломе (ММ) человека.

**Материалы и методы.** Исследовано 26 образцов костномозговых аспиратов, полученных от 26 больных – 14 мужчин и 12 женщин. У всех пациентов была диагностирована ММ III стадии. Возраст пациентов составлял от 52 до 72 лет. Из образцов костномозговых аспиратов с помощью центрифугирования в градиенте Ficoll получали мононуклеарную фракцию клеток костного мозга, содержащую плазматические клетки. Далее проводили процедуру выделения РНК и с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией исследовали экспрессию мРНК генов IGF-1 и MDR1/ABCB1.

**Результаты.** Проведен анализ общей выживаемости (ОВ) пациентов с ММ в зависимости от экспрессии гена IGF-1. Показано, что для пациентов с ММ, у которых наблюдается высокий уровень экспрессии IGF-1, характерно уменьшение показателя ОВ и, наоборот, при слабой экспрессии IGF-1 или при отсутствии его экспрессии наблюдается увеличение ОВ. Исследования экспрессии гена IGF-1 и гена MDR1/ABCB1, ответственного за возникновение множественной лекарственной устойчивости, показали, что у больных ММ эти гены коэкспрессируются.

**Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что высокий уровень экспрессии гена IGF-1 может являться неблагоприятным прогностическим фактором при ММ. IGF-1 может участвовать в регуляции механизмов возникновения множественной лекарственной устойчивости у больных ММ.

**Ключевые слова:** множественная миелома, общая выживаемость, IGF-1, MDR1/ABCB1

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-42-49

## THE OVEREXPRESSION OF IGF-1 IS A POOR PROGNOSTIC FACTOR IN MULTIPLE MYELOMA

S.S. Shushanov<sup>1</sup>, T.A. Kravtsova<sup>1</sup>, A.V. Vaiman<sup>1</sup>, N.P. Akentieva<sup>2</sup>, Yu.B. Chernykh<sup>3</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

<sup>2</sup>Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences;

1 Prospect Akademika Semenova, Chernogolovka, Moscow region 142432, Russia;

<sup>3</sup>M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute; 61/2 Shchepkina St., Moscow 129110, Russia

**Introduction.** Insulin-like growth factors (IGF) are one of the widely studied factors in oncology. For tumors with a high expression level of IGF typical postoperative relapse, they are invasive and give distant metastases. There are also data on the participation of IGF in the emergence of resistance to anticancer drugs. The mechanisms that determine the influence of insulin-like growth factors on the progression of a number of malignant neoplasms remain undisclosed and carrying out fundamental research in this direction is relevant.

**Objective:** to study the role of IGF type 1 (IGF-1) in multiple myeloma (MM).

**Materials and methods.** 26 samples of bone marrow aspirates received from 26 patients – 14 men and 12 women – were studied in the work. All patients were diagnosed with stage III MM. The age of patients ranged from 52 to 72 years. From the obtained bone marrow aspirates, using centrifugation in the Ficoll gradient, a mononuclear fraction of bone marrow cells containing plasma cells was obtained. Then we carried out the procedure of extracting RNA and using polymerase chain reaction with reverse transcription, we studied the expression of mRNA of the genes of IGF-1 and MDR1/ABCB1.

**Results.** The paper analyzes the overall survival (OS) of patients with MM depending on the expression of the gene *IGF-1*. It is shown that for patients with MM who have a high level of *IGF-1* expression, a decrease in OS is characteristic and, conversely, with a weak expression of *IGF-1* or in the absence of its expression, an increase in OS is observed. Studies of expression of *IGF-1* gene and *MDR1/ABCB1* gene responsible for the occurrence of multiple drug resistance showed that these genes are co-expressed in patients with MM. **Conclusion.** The obtained results indicate that the high level of *IGF-1* gene expression may be a poor prognostic factor in MM. *IGF-1* may participate in regulation of the mechanisms of emergence of multiple drug resistance in patients with MM.

**Key words:** multiple myeloma, overall survival, *IGF-1*, *MDR1/ABCB1*

## Введение

Множественная миелома (ММ) относится к В-лимфоплазмочитарным злокачественным заболеваниям с сохраненной функцией синтеза опухолевой клеткой моноклонального иммуноглобулина парапротеина. Она составляет 1 % от всех онкологических заболеваний и немногим более 10 % среди всех гемобластозов [1]. Одним из свойств клеток ММ является их способность мигрировать и локализоваться в костном мозге [1, 2]. В микроокружении костного мозга клетки ММ взаимодействуют с клетками стромы костного мозга и активируют в них транскрипцию и секрецию различных цитокинов и факторов роста [3–5]. Воздействие этих факторов на миеломные клетки может придать им более агрессивные свойства – стимулировать размножение, усилить выживаемость, активировать механизмы возникновения лекарственной устойчивости и др. Поэтому исследование роли цитокинов и факторов роста в злокачественной прогрессии ММ является актуальным и ему посвящено немало работ.

Одним из активно исследуемых факторов роста при ММ является инсулиноподобный фактор роста 1 (*IGF-1*). *IGF-1* в большом количестве присутствует в сыворотке крови пациентов с ММ, а также в микроокружении костного мозга, где он продуцируется различными типами клеток, в том числе фибробластами и остеобластами. Предполагается, что клетки ММ получают от *IGF-1* дополнительную паракринную стимуляцию. Подтверждением этого сценария был выявленный факт, что для выживания клеток ММ, полученных от больных, необходима экзогенная активация *IGF-1*-зависимого сигнального пути [1]. В литературе имеются данные о том, что активация *IGF-1*-зависимого сигнального пути может придать клеткам ММ более агрессивные свойства – стимулировать пролиферацию и усилить их выживаемость [6, 7].

Мы обнаружили, что для пациентов с ММ, у которых наблюдается высокий уровень экспрессии гена *IGF-1*, характерна низкая общая выживаемость (ОВ) и, наоборот, когда уровень экспрессии гена *IGF-1* низкий, наблюдается высокая ОВ. Молекулярные механизмы, объясняющие взаимосвязь между экспрессией *IGF-1* и показателем ОВ, не изучены. Мы предположили, что одним из механизмов,

объясняющих низкую ОВ пациентов с ММ, может являться *IGF-1*-зависимая гиперэкспрессия гена АВС-транспортера *MDR1/ABCB1*. Известно, что этот ген у многих больных ММ гиперэкспрессируется и приводит к развитию множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), которая становится основной причиной потери ответа на лечение и, как следствие, причиной смертности [8–10]. Для проверки этого предположения в образцах костномозговых пунктатов, полученных от больных ММ, нами была исследована экспрессия генов *IGF-1* и *MDR1/ABCB1*. В ходе исследования мы установили, что у больных ММ эти гены коэкспрессируются.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что *IGF-1* может участвовать в регуляции возникновения МЛУ у больных ММ и что высокая экспрессия гена *IGF-1* может являться неблагоприятным прогностическим фактором при ММ.

## Материалы и методы

В работе было исследовано 26 образцов, полученных от 26 больных – 14 мужчин и 12 женщин. У всех пациентов была диагностирована ММ III стадии. Возраст пациентов составлял от 52 до 72 лет. Диагноз ММ устанавливался на основании плазмочелочной инфильтрации костного мозга, иммунохимического исследования сыворотки крови и мочи, рентгенологических данных. Стадирование на момент диагностики проводили по общепринятой системе В.Г.М. Durie и С.Е. Salmon [11]. Мононуклеарная фракция костного мозга содержала более 70 % опухолевых плазматических клеток. Иммунохимическим исследованием установлено, что у 8 пациентов плазматические клетки секретировали PIg (патологический иммуноглобулин) G kappa (Gκ), у 3 – PIg G lambda (Gλ), у 5 – PIg G kappa + Bj kappa (Gκ + Bjk), у 1 – PIg Bj + A lambda (Bj/Aλ), у 4 – PIg A kappa (Aκ), у 2 больных была определена секреция PIg M kappa (Mκ), у 1 пациента Bj и у 2 пациентов PIg не определяли. На момент исследования у всех больных была зарегистрирована клиническая резистентность к схемам химиотерапии, содержащим алкилирующие агенты: схема CSVP (циклофосфан, сарколизин, винкристин, преднизолон) и схема M2 (мелфалан, циклофосфан, ломустин, винкристин, преднизолон).

**Таблица 1.** Нуклеотидные последовательности специфических праймеров к исследуемым генам, размер продукта, температура отжига праймеров и количество циклов, используемых в ПЦР

| Ген          | Название праймера  | Нуклеотидная последовательность  | Размер продукта, п. о. | Температура отжига праймера, °С | Количество циклов |
|--------------|--------------------|--|------------------------|---------------------------------|-------------------|
| <i>MDR1</i>  | MDR1-F<br>MDR1-R   | 5'-CCCATCATTGCAATAGCAGG-3'<br>5'-GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA-3'                    | 167                    | 60                              | 34                |
| <i>IGF-1</i> | IGF-1-F<br>IGF-1-R | 5'-GGACCGGAGACGCTCTGCGG-3'<br>5'-TCTACTTGCGTTCTTCAAAT-3'                     | 284                    | 60                              | 36                |
| <i>GAPDH</i> | GAPDH-F<br>GAPDH-R | 5'-CCCCTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTTT-3'<br>5'-GGCCATGAGGTCCACCACCTGTTGCTGTA-3' | 513                    | 60                              | 23                |

**Выделение РНК из клеток костного мозга и электрофорез.** Для исследования экспрессии генов от больных получали костномозговой пунктат (аспират), из которого в дальнейшем выделяли РНК. С этой целью клетки костного мозга наслаивали на 3 мл Ficoll и центрифугировали при 1500 об/мин 30 мин, после чего на границе раздела фаз отбирали мононуклеарную фракцию клеток костного мозга, содержащую плазматические клетки. Далее отобранные клетки переносили в пробирку с 8 мл раствора Эрла, пересаживали центрифугированием при 1500 об/мин 10 мин и отмывали в 2–3 мл раствора Эрла. К осадку клеток добавляли 1 мл тризола (Trizol, Sigma, США). Процедуру выделения РНК проводили согласно стандартному протоколу. Электрофорез выделенной РНК выполняли в 1 % агарозном геле при напряжении 100 В в течение 30–40 мин. Качество выделенной РНК оценивали по наличию полос рибосомальной РНК. Концентрацию РНК определяли по оптическому поглощению при длине волны 260 нм.

**Полуколичественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).** Экспрессию мРНК исследуемых генов определяли полуколичественным методом ОТ-ПЦР. Реакционная смесь для синтеза кДНК содержала: 2 мкг тотальной клеточной РНК; 4 мкл «случайных» праймеров (гексануклеотиды) («Литех», Россия); 2 мМ смеси dNTP (MBI Fermentas); 2–4 ед. ингибитора РНКаз (MBI Fermentas); 100 ед. обратной транскриптазы M-MuLV (MBI Fermentas). Объем смеси составлял 25 мкл. Синтез кДНК с матрицы РНК проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) со следующими параметрами: обратная транскрипция –42 °С, 50 мин; денатурация –94 °С, 5 с. Для наработки продуктов ПЦР составляли реакционную смесь, содержащую: 1 мкл раствора кДНК; 20 пкмоль каждого из праймеров; 2 мМ смеси dNTP (MBI Fermentas); 2,5 мкл 10-кратного буфера с  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (MBI Fermentas), 25 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 1 ед. Taq-ДНК полимеразы;  $\text{H}_2\text{O}$  до конечного объема 25 мкл; минерального масла – 30 мкл. Реакцию амплификации проводи-

ли на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) по следующей схеме: денатурация –94 °С, 10 с; отжиг –  $T_m$ , 10 с; синтез –72 °С, 20 с. Нами подобраны оптимальные условия ОТ-ПЦР для достижения линейной зависимости между числом циклов и количеством продуктов ПЦР. Значения температуры  $T_m$ , число циклов ПЦР для каждого из генов, а также нуклеотидные последовательности использованных специфических праймеров приведены в табл. 1. В качестве внутреннего контроля для оценки количества взятой в реакцию РНК определяли экспрессию мРНК гена *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа). Продукты реакции ОТ-ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Гель фотографировали при ультрафиолетовом возбуждении с помощью цифровой камеры Samsung CCTV LENZ. Размеры фрагментов оценивали в соответствии с расположением полос маркерной ДНК, а числовое значение интенсивности свечения продуктов ПЦР оценивали денситометрированием с использованием компьютерной программы Scion Image-Release Alpha 4.0.3.2. Приведенные в табл. 2 и 3 цифры соответствуют нормализованным значениям показателей экспрессии *IGF-1/GAPDH* и *MDR1/GAPDH*. Для удобства нами использованы знаки «+» и «–». При этом «–» означает, что экспрессия гена отсутствует; «+/-» – экспрессия гена в цифровом значении в интервале  $0,5 < d$ ; «+» – экспрессия гена в цифровом значении в интервале  $(0,5 \leq d < 1,5)$ ; «++» – экспрессия гена в интервале  $(1,5 \leq d < 2,5)$ ; «+++» – экспрессия гена в интервале  $(2,5 \leq d < 3,5)$  и т. д., где  $d$  – нормализованное значение экспрессии мРНК исследуемого гена.

**Статистическая обработка данных.** Для статистического анализа полученных данных использовалась программа GraphPad Prizm 5.02 (GraphPad Software Inc). Для определения значимых различий применяли t-критерий Стьюдента при сравнении 2 групп. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ . Для оценки корреляционной зависимости между экспрессией исследуемых генов использовали метод

Таблица 2. Уровень экспрессии мРНК *IGF-1* у больных ММ

| Уровень экспрессии мРНК                                   | № образца, полученного от больного ММ | <i>IGF-1/GAPDH</i> , «+» и «-» | <i>IGF-1/GAPDH</i> , значения в цифрах |
|---|---------------------------------------|--------------------------------|--|
| Группа А.<br>Уровень экспрессии мРНК <i>IGF-1</i> высокий | 26                                    | +++++                          | 4,54                                   |
|   | 7                                     | +++                            | 3,11                                   |
|   | 17                                    | ++                             | 1,60                                   |
|   | 20                                    | ++                             | 1,50                                   |
|   | 13                                    | ++                             | 1,50                                   |
|   | 2                                     | ++                             | 1,50                                   |
|   | 12                                    | +                              | 1,36                                   |
|   | 1                                     | +                              | 1,31                                   |
|   | 3                                     | +                              | 1,30                                   |
|   | 11                                    | +                              | 1,23                                   |
|   | 14                                    | +                              | 1,11                                   |
|   | 5                                     | +                              | 1,00                                   |
| Группа В.<br>Уровень экспрессии мРНК <i>IGF-1</i> низкий  | 10                                    | +                              | 0,80                                   |
|   | 18                                    | +                              | 0,52                                   |
|   | 19                                    | +                              | 0,53                                   |
|   | 25                                    | +/-                            | 0,32                                   |
|   | 22                                    | +/-                            | 0,32                                   |
|   | 15                                    | +/-                            | 0,20                                   |
|   | 16                                    | +/-                            | 0,16                                   |
|   | 4                                     | -                              | 0,00                                   |
|   | 6                                     | -                              | 0,00                                   |
|   | 8                                     | -                              | 0,00                                   |
|   | 9                                     | -                              | 0,00                                   |
|   | 21                                    | -                              | 0,00                                   |
| 23  | -                                     | 0,00                           |  |
| 24  | -                                     | 0,00                           |  |

линейной корреляции Пирсона ( $r$ ). Для определения ОВ пациентов с ММ использовали тест Каплана–Майера. При распределении, отличном от нормального, для оценки значимых различий между 2 выборками применяли U-критерий Манна–Уитни.

### Результаты и обсуждение

Методом полуколичественной ОТ-ПЦР мы исследовали экспрессию мРНК *IGF-1* и *GAPDH* в 26 образцах костномозговых пунктатов, полученных от 26 больных ММ (рис. 1, 2). Нормализованные значения экспрессии *IGF-1/GAPDH* приведены в табл. 2. Экспрессия *IGF-1* гетерогенная и выявлена в 19 (73 %) из 26 образцов ММ. В 7 (27 %) образцах мРНК *IGF-1* не экспрессировалась. Нами были определены 2 группы образцов: А и В (см. табл. 2). В группу А вошли образцы с высокой экспрессией мРНК гена *IGF-1* ( $\geq 0,8$ ), а в группу В – образцы с низкой экспрессией мРНК гена *IGF-1* ( $< 0,8$ ). Средние значения экспрессии мРНК гена *IGF-1* в группах А и В представлены на рис. 3. Разница в экспрессии мРНК *IGF-1* в этих группах является статистически значимой ( $p < 0,001$ ).

Данные, полученные по экспрессии мРНК гена *IGF-1* в группах А и В, мы сопоставили с показателем ОВ больных ММ в этих группах (рис. 4). К 60 мес наблюдения в группе с высокой экспрессией гена *IGF-1* остаются в живых немногим более 20 % пациентов, тогда как в группе, где экспрессия этого гена низкая, за это же время в живых остаются 60 % пациентов. Тем не менее к 100 мес наблюдения все исследованные пациенты погибают. Медиана ОВ в группе пациентов с низкой экспрессией гена *IGF-1* составляет более 5 лет (62 мес), а в группе с высокой экспрессией гена *IGF-1* – менее 3 лет (34 мес). Расчет U-критерия Манна–Уитни показал, что разница между медианами ОВ в группах А и В является статистически значимой ( $p < 0,05$ ). Таким образом, если оценивать выживаемость по медианам ОВ, то можно утверждать, что чем выше экспрессия гена *IGF-1*, тем ниже показатель ОВ пациентов с ММ. Вместе с тем тест Каплана–Майера не показал достоверных различий между группами ( $p = 0,2$ ). Отсутствие достоверных отличий между ОВ больных в группах А и В может быть связано с тем, что все пациенты к 100 мес погибают и кривые на графике после 60 мес начинают сходиться. Другая причина отсутствия

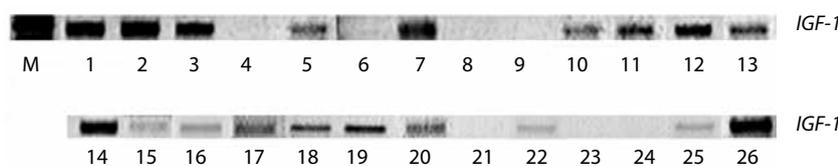
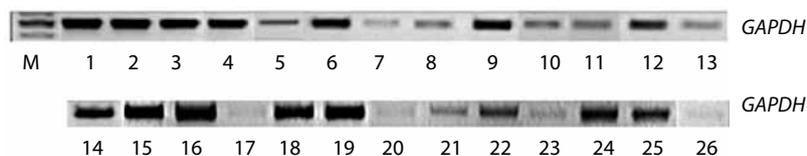
Рис. 1. Экспрессия мРНК гена *IGF-1* в образцах костномозговых пунктатов больных ММ

Таблица 3. Коэкспрессия мРНК *IGF-1* и мРНК *MDR1* у больных ММ

| Уровень экспрессии мРНК                                | № образца, полученного от больного ММ                 | <i>IGF-1/GAPDH</i> , «+» и «-» | <i>IGF-1/GAPDH</i> , значения в цифрах | <i>MDR1/GAPDH</i> , «+» и «-» | <i>MDR1/GAPDH</i> , значения в цифрах |
|--|---|--------------------------------|--|-------------------------------|---------------------------------------|
| Группа А. Уровень экспрессии мРНК <i>IGF-1</i> высокий | 26  | +++++                          | 4,54                                   | +++                           | 3,31                                  |
|  | 7   | +++                            | 3,11                                   | +++                           | 3,34                                  |
|  | 17  | ++                             | 1,60                                   | ++++                          | 3,54                                  |
|  | 20  | ++                             | 1,50                                   | ++                            | 1,51                                  |
|  | 13  | ++                             | 1,50                                   | ++++                          | 4,43                                  |
|  | 2   | ++                             | 1,50                                   | ++                            | 1,81                                  |
|  | 12  | +                              | 1,36                                   | ++                            | 2,42                                  |
|  | 1   | +                              | 1,31                                   | ++                            | 1,85                                  |
|  | 3   | +                              | 1,30                                   | ++                            | 1,86                                  |
|  | 11  | +                              | 1,23                                   | +++                           | 2,63                                  |
|  | 14  | +                              | 1,11                                   | ++                            | 1,85                                  |
|  | 5   | +                              | 1,00                                   | +                             | 1,00                                  |
|  | 10  | +                              | 0,80                                   | +++                           | 3,16                                  |
|  | Группа В. Уровень экспрессии мРНК <i>IGF-1</i> низкий | 18                             | +                                      | 0,52                          | +                                     |
| 19   |   | +                              | 0,53                                   | +                             | 0,74                                  |
| 25   |   | +/-                            | 0,32                                   | +                             | 0,89                                  |
| 22   |   | +/-                            | 0,32                                   | +                             | 0,91                                  |
| 15   |   | +/-                            | 0,20                                   | +                             | 0,96                                  |
| 16   |   | +/-                            | 0,16                                   | +                             | 0,85                                  |
| 4  |   | -                              | 0,00                                   | +                             | 1,40                                  |
| 6  |   | -                              | 0,00                                   | +                             | 1,38                                  |
| 8  |   | -                              | 0,00                                   | ++                            | 1,73                                  |
| 9  |   | -                              | 0,00                                   | +                             | 1,41                                  |
| 21   |   | -                              | 0,00                                   | +                             | 1,23                                  |
| 23   |   | -                              | 0,00                                   | +                             | 1,32                                  |
| 24   | -   | 0,00                           | +                                      | 0,75                          |                                       |

Рис. 2. Экспрессия мРНК гена *GAPDH* в образцах костномозговых пунктатов больных ММ

достоверных отличий может быть связана с небольшим количеством пациентов в выборке.

Таким образом, в ходе исследования нами выявлена обратная корреляция между уровнем экспрессии гена *IGF-1* и показателем ОБ пациентов с ММ.

Полученные данные свидетельствуют о том, что высокая экспрессия гена *IGF-1* может являться неблагоприятным прогностическим фактором при ММ.

Однозначно объяснить механизм причинно-следственной взаимосвязи между уровнем экспрессии

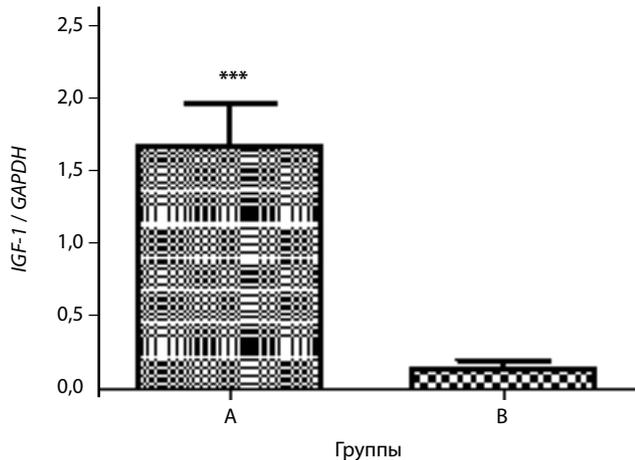


Рис. 3. Средние значения экспрессии мРНК IGF-1 в группах А и В. \*\*\* $p < 0,0001$

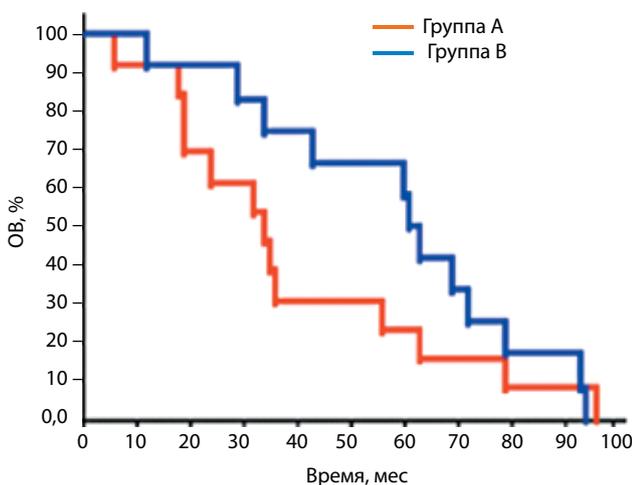


Рис. 4. ОВ пациентов с ММ в группе А (уровень экспрессии мРНК IGF-1 высокий) и в группе В (уровень экспрессии мРНК IGF-1 низкий)

гена *IGF-1* и показателем ОВ больных ММ сложно. Известно, что при повторном и/или длительном лечении онкобольных цитостатиками может произойти отбор и последующее размножение тех опухолевых клеток, в которых гиперэкспрессируются гены, определяющие возникновение МЛУ. Одним из таких генов является ген АВС-транспортера *MDR1/ABCB1*. В ряде работ было показано, что при длительном лечении у пациентов с ММ этот ген гиперэкспрессируется и это ассоциируется с рецидивом и возникновением резистентности [8–10]. Поскольку

у исследованных нами пациентов с высоким уровнем экспрессии гена *IGF-1* была зарегистрирована клиническая резистентность к химиотерапии, мы предположили, что одной из причин низкой ОВ больных ММ может быть возникновение *IGF-1*-зависимой МЛУ. Для проверки этой гипотезы в указанных образцах ММ методом полуколичественной ОТ-ПЦР мы исследовали экспрессию мРНК гена *MDR1/ABCB1* (рис. 5). Нормализованные значения экспрессии *MDR1/GAPDH* приведены в табл. 3.

С использованием метода линейной корреляции Пирсона ( $r$ ) мы провели оценку корреляционной зависимости между экспрессией мРНК *IGF-1* и мРНК *MDR1/ABCB1*. Проведенный анализ показал, что экспрессия мРНК *IGF-1* достоверно коррелирует с экспрессией мРНК *MDR1/ABCB1* ( $r = 0,67$ ;  $p < 0,0002$ ). Далее мы провели оценку средних значений экспрессии мРНК *MDR1/ABCB1* в группах А и В (рис. 6). Разница в экспрессии мРНК *MDR1/ABCB1* в этих группах является статистически значимой ( $p < 0,001$ ). При сравнении экспрессии генов *IGF-1* и *MDR1/ABCB1* мы обнаружили, что в группе А, где отмечается высокая экспрессия гена *IGF-1* (см. рис. 3), также наблюдается высокая экспрессия гена *MDR1/ABCB1* (см. рис. 6). И наоборот, в группе В, где отмечается низкий уровень экспрессии гена *IGF-1*, также наблюдается низкий уровень экспрессии гена *MDR1/ABCB1*. Полученные данные показывают, что показатели экспрессии гена *IGF-1* и гена *MDR1* при ММ коррелируют.

Таким образом, при исследовании клинического материала нами установлено, что для пациентов с ММ, у которых наблюдается высокий уровень экспрессии гена *IGF-1*, характерна низкая ОВ. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что высокая экспрессия гена *IGF-1* может являться неблагоприятным прогностическим фактором при ММ. Возможно, что одной из причин низкой ОВ больных ММ является активация *IGF-1*-зависимого сигнального пути, которая придает клеткам ММ более агрессивные свойства – активирует механизмы возникновения МЛУ. Это предположение подтверждается тем, что в образцах, полученных от больных ММ, наблюдается корреляция экспрессии мРНК *IGF-1* и экспрессии мРНК *MDR1/ABCB1*. Такая корреляция установлена впервые и предполагает, что фактор роста *IGF-1* участвует в регуляции экспрессии гена *MDR1/ABCB1*.

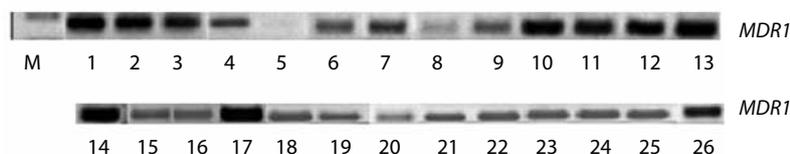


Рис. 5. Экспрессия мРНК гена *MDR1* в образцах костномозговых пунктатов больных ММ

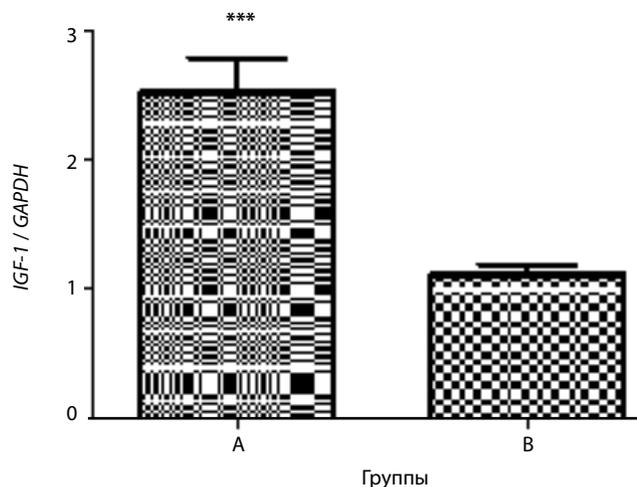


Рис. 6. Средние значения экспрессии мРНК гена *MDR1* в группах А и В. \*\*\* $p < 0,001$

В пользу такого предположения свидетельствует тот факт, что в промоторной области гена *MDR1/ABCB1* имеется сайт связывания с транскрипционным фактором NF-κB, экспрессия которого регулируется IGF-1 [12–14]. Не исключено, что в микроокружении костного мозга IGF-1, продуцируемый фибробластами и остеобластами, воздействует на клетки ММ паракринным образом и активирует в них экспрессию транскрипционного фактора NF-κB, который, в свою очередь, активирует в клетках ММ экспрессию *MDR1/ABCB1*.

В литературе имеется несколько работ, посвященных изучению взаимосвязи между IGF-1 и возникновением лекарственной устойчивости к некоторым химиопрепаратам при ММ. Так, например, в работе P. Maiso и соавт. показано, что ингибирование тирозинкиназной активности рецептора IGF-1 (IGF-1R) усиливает действие леналидомида, дексаметазона, мелфалана и бортезомиба, а использование ингибитора тирозинкиназной активности IGF-1R совместно с дексаметазоном и бортезомибом подавляет рост клеток ММ *in vitro* [15]. Также показано, что в линиях клеток ММ, резистентных к бортезомибу, и в клинических образцах, полученных от боль-

ных ММ, которые были нечувствительны к бортезомибу, обнаруживается высокий уровень IGF-1 и активирован IGF-1/IGF-1R-зависимый сигнальный путь. Блокирование этого сигнального пути усилило гибель клеток ММ от воздействия бортезомиба [16, 17]. Также имеется и наша более ранняя работа, в которой мы исследовали небольшое количество больных ММ [18]. Таким образом, в литературе накапливаются данные, свидетельствующие в пользу того, что IGF-1, присутствующий в микроокружении костного мозга, действительно может участвовать в возникновении лекарственной устойчивости.

Наше предположение о том, что фактор роста IGF-1 регулирует экспрессию гена *MDR1/ABCB1*, основано на корреляционных данных, поэтому дальнейшие исследования в этом направлении мы продолжим на культурах клеток ММ.

### Заключение

В аспиратах костного мозга, полученных от больных ММ, исследована экспрессия мРНК гена *IGF-1* и проведен анализ ОБ пациентов с ММ. Исследования показали, что для больных с высоким уровнем экспрессии гена *IGF-1* характерен низкий показатель ОБ. Эти данные получены впервые и свидетельствуют о том, что высокая экспрессия гена *IGF-1* может являться неблагоприятным прогностическим фактором при ММ.

Поскольку у больных ММ с высоким уровнем экспрессии гена *IGF-1* была зарегистрирована клиническая резистентность к химиотерапии, мы предположили, что одним из механизмов, объясняющих низкую ОБ при гиперэкспрессии гена *IGF-1*, может являться IGF-1-опосредованное возникновение МЛУ. Исследования экспрессии гена *MDR1/ABCB1*, ответственного за возникновение МЛУ, показали, что ген *IGF-1* и ген *MDR1/ABCB1* у больных ММ коэкспрессируются. Полученные данные позволяют предположить, что *IGF-1* может участвовать в механизмах возникновения МЛУ при ММ посредством активации экспрессии гена *MDR1/ABCB1*.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Вотякова О.М., Демина Е.А. Множественная миелома. В кн.: Клиническая онкогематология. Руководство для врачей. Под ред. М.А. Волковой. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2007. С. 847–73. [Votyakova O.M., Demina E.A. Multiple myeloma. In: Clinical oncohematology. A guide for physicians. Ed. by M.A. Volkova. 2<sup>nd</sup> edn, revised and updated. Moscow: Medicine, 2007. Pp. 847–73. (In Russ.)].
2. Шушанов С.С. Роль инсулиноподобного фактора роста 1 типа (IGF-1) и некоторых других членов системы IGF/инсулин в прогрессии множественной миеломы. Российский биотерапевтический журнал 2012;11(3):71–80. [Shushanov S.S. The role of insulin-like growth factor 1 type (IGF-1) and some other members of the IGF/insulin system in the progression of multiple myeloma. Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2012;11(3):71–80. (In Russ.)].
3. Yang W.C., Lin S.F., Su Y.C. Multiple Myeloma: Personalised Medicine Based on Pathogenesis. EMJ 2018;3(2):78–89.

4. Lohit K.K., Bhubaneswar S. Recent advances in molecular pathogenesis of multiple myeloma – Role of cytokine: Review of literature. *Int J Med Health Res* 2016;2(3):43–5.
5. Jurczynszyn A., Czepiel J., Gdula-Argasińska J. et al. The analysis of the relationship between multiple myeloma cells and their micro-environment. *J Cancer* 2015;6(2):160–8. DOI: 10.7150/jca.10873. PMID: 25561981.
6. Bieghs L., Brohus M., Kristensen I.B. et al. Abnormal IGF-binding protein profile in the bone marrow of multiple myeloma patients. *PLoS One* 2016;11(4):e0154256. DOI: 10.1371/journal.pone.0154256. PMID: 27111220.
7. Bieghs L., Johnsen H.E., Maes K. et al. The insulin-like growth factor system in multiple myeloma: diagnostic and therapeutic potential. *Oncotarget* 2016;7(30):48732–52. DOI: 10.18632/oncotarget.8982. PMID: 27129151.
8. Nass J., Efferth T. Drug targets and resistance mechanisms in multiple myeloma. *Cancer Drug Resist* 2018;1:87–117. DOI: 10.20517/cdr.2018.04.
9. Krishnan S.R., Jaiswal R., Brown R.D. et al. Multiple myeloma and persistence of drug resistance in the age of novel drugs. *Int J Oncol* 2016;49(1):33–50. DOI: 10.3892/ijo.2016.3516. PMID: 27175906.
10. Черных Ю.Б., Голенков А.К., Шушанов С.С. и др. Влияние экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости при множественной миеломе на клиническое течение заболевания. *Альманах клинической медицины* 2016;44(5):624–30. [Chernykh Yu.B., Golenkov A.K., Shushanov S.S. et al. The effect of gene expression of multidrug resistance in multiple myeloma on the clinical course of the disease. *Almanakh klinicheskoy meditsiny = Almanac of Clinical Medicine* 2016;44(5):624–30. (In Russ.)].
11. Durie B.G., Salmon S.E. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975;36(3):842–54. PMID: 1182674.
12. Demchenko Y.N., Kuehl W.M. A critical role for the NFκB pathway in multiple myeloma. *Oncotarget* 2010;1(1):58–69. DOI: 10.18632/oncotarget.109. PMID: 20890394.
13. Mitsiades C.S., Mitsiades N., Poulaki V. et al. Activation of NF-κB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene* 2002;21(37):5673–83. DOI: 10.1038/sj.onc.1205664. PMID: 12173037.
14. Bentires-Alj M., Barbu V., Fillet M. et al. NF-κB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene* 2003;22(1):90–7. DOI: 10.1038/sj.onc.1206056. PMID: 12527911.
15. Maiso P., Ocio E.M., Garayoa M. et al. The insulin-like growth factor-I receptor inhibitor NVP-AEW541 provokes cell cycle arrest and apoptosis in multiple myeloma cells. *Br J Haematol* 2008;141(4):470–82. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07049.x. PMID: 18341634.
16. Kuhn D.J., Berkova Z., Jones R.J. et al. Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor to overcome bortezomib resistance in preclinical models of multiple myeloma. *Blood* 2012;120(16):3260–70. DOI: 10.1182/blood-2011-10-386789. PMID: 22932796.
17. Abdi J., Chen G., Chang H. Drug resistance in multiple myeloma: latest findings and new concepts on molecular mechanisms. *Oncotarget* 2013;4(12):2186–207. DOI: org/10.18632/oncotarget.1497. PMID: 24327604.
18. Шушанов С.С., Марьяна Л.Г., Черных Ю.Б., Какпакова Е.С. Коэкспрессия мРНК генов систем IGF/инсулин и множественной лекарственной устойчивости у больных множественной миеломой. *Клиническая онкогематология* 2010;3(2):105–13. [Shushanov S.S., Maryina L.G., Chernykh Yu.B., Kakpakova E.S. Coexpression of IGF/insulin gene mRNA and multidrug resistance in patients with multiple myeloma. *Klinicheskaya onkologematologiya = Clinical Oncohematology* 2010;3(2):105–13. (In Russ.)].

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

# КОМПЛЕКСНОЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

А.А. Солодовник<sup>1</sup>, А.С. Мкртчян<sup>2</sup>, В.А. Мисюрин<sup>1</sup>, Л.А. Кесаева<sup>1</sup>, Н.Н. Касаткина<sup>1</sup>,  
О.М. Вотякова<sup>1</sup>, О.Ю. Якимович<sup>1</sup>, Е.Г. Медведовская<sup>1</sup>, А.С. Антипова<sup>1</sup>, И.З. Заводнова<sup>1</sup>,  
О.А. Коломейцев<sup>1</sup>, А.Д. Ширин<sup>1</sup>, Е.А. Османов<sup>3</sup>, А.В. Мисюрин<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>ООО «ГеноТехнология»; Россия, 117279 Москва, Профсоюзная ул., 104;

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);  
Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

**Контакты:** Алена Александровна Солодовник [aliona1363@rambler.ru](mailto:aliona1363@rambler.ru)

**Актуальность.** Множественная миелома (ММ) – злокачественное В-клеточное лимфопролиферативное заболевание с клональной пролиферацией плазматических клеток, продуцирующих моноклональный иммуноглобулин, в костном мозге и за его пределами. В настоящее время в качестве прогностических факторов исследуется широкий спектр цитогенетических аномалий и молекулярно-биологических параметров.

**Цель работы** – сравнительное исследование частоты, характера и клинической значимости хромосомных нарушений при ММ методами стандартной цитогенетики и флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH).

**Материалы и методы.** В исследование включены 77 больных с ММ, наблюдавшихся в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в 2016–2017 гг. Пациенты были в возрасте от 34 до 77 лет, медиана – 53 года. Женщин было 42 (54,5 %), мужчин – 35 (45,5 %).

**Результаты.** Метод стандартного карiotипирования (G-бэндинг) позволил выявить хромосомные изменения лишь у 1 из 77 больных. Однако методом FISH были обнаружены хромосомные aberrации уже у 26 % пациентов (20 из 77). Делеции различных участков исследуемых локусов хромосом, свидетельствующих о возможном наличии гиподиплоидного клона или потери отдельных регионов, обнаружены у 1 больного только при повторном обследовании с интервалом 6 мес. Среди пациентов с хромосомными нарушениями ( $n = 20$ ) аномалии типа частичной трисомии 11q, делеции участка q32 хромосомы 14, транслокации t(4;14)(p16;q32) и перестройки генов IGHV обнаружены у 30 % (6 из 20). У 14 из 20 больных выявлены 2 и более хромосомных нарушения. Хромосомные аномалии с большей частотой обнаруживаются на более поздних стадиях ММ (IA и IIA стадии – 0 % наблюдений с aberrациями, IIIA и IIIB – 27 и 47 % соответственно).

**Заключение.** FISH позволяет обнаружить хромосомные нарушения в опухолевых плазматических клетках независимо от фазы митоза. При ММ это приобретает особо важное значение в связи с низкой пролиферативной активностью плазмоцитов. Кроме того, FISH позволяет обнаружить субмикроскопические, т. е. скрытые хромосомные aberrации, которые встречаются у трети больных ММ. Совершенствование панели зондов и широкое применение FISH не означает пренебрежение методами стандартной цитогенетики. G-бэндинг позволяет увидеть нарушения сразу всех хромосом в отличие от локус-специфичного FISH-анализа.

**Ключевые слова:** множественная миелома, цитогенетические нарушения, флуоресцентная *in situ* гибридизация

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-50-59

## COMPLEX CYTOGENETIC RESEARCH OF CRYPTIC CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

A.A. Solodovnik<sup>1</sup>, A.S. Mkrtychyan<sup>2</sup>, V.A. Misyurin<sup>1</sup>, L.A. Kesaeva<sup>1</sup>, N.N. Kasatkina<sup>1</sup>, O.M. Votyakova<sup>1</sup>, O.Yu. Yakimovich<sup>1</sup>,  
E.G. Medvedovskaya<sup>1</sup>, A.S. Antipova<sup>1</sup>, I.Z. Zavodnova<sup>1</sup>, O.A. Kolomeytshev<sup>1</sup>, A.D. Shirin<sup>1</sup>, E.A. Osmanov<sup>3</sup>, A.V. Misyurin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation;  
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

<sup>2</sup>LLC GeneTechnology; 104 Profsojuznaya St., Moscow 117279, Russia;

<sup>3</sup>Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation;  
Build. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

**Background.** Multiple myeloma (MM) is a malignant lymphoproliferative B-cell disease characterization by clonal proliferation of plasma cells in the bone marrow and beyond its borders. Currently, a wide range of cytogenetic anomalies and molecular-biological parameters are studied as prognostic factors.

**Objective:** a comparative study of the frequency, features and clinical significance of chromosomal abnormalities in MM by conventional cytogenetic and fluorescent in situ hybridization (FISH) methods.

**Materials and methods.** 77 patients with MM, which admitted in N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, were included in the study from 2016 to 2017.

**Results.** Chromosomal alterations were detected only in one case (1/77) by conventional cytogenetic method G-banding. However cytogenetic aberrations were revealed in 26 % of cases (20/77) using FISH. Deletions of different regions of chromosomes, indicating the possible presence of a hypodiploid clone or loss of some regions, were found in one patient in the second FISH analysis after 6 months. In the cohort of patients with chromosomal abnormalities ( $n = 20$ ) a partial trisomy 11q, a deletion of the region q32 of the chromosome 14, a translocation  $t(4;14)(p16;q32)$  and IGHV gene rearrangement were determined in 30 % (6/20) as sole anomalies. Two or more cytogenetic aberrations were identified in the remaining 14 patients. Our study confirms that chromosomal abnormalities are more likely detected at later stages of MM (IA u IIA – 0 %, IIIA u IIIB – 27 and 47 % respectively).

**Conclusion.** FISH allows to detect chromosomal changes in tumor plasma cells regardless of the mitosis phase. In MM, it becomes particularly important in connection with low proliferative activity of plasma cells. Additionally, in the fourth of MM patients in the study submicroscopic chromosomal aberrations were discovered using FISH. The improvement of the probe panel and the widespread use of locus specific FISH don't replace G-banding that allows to see damages of all chromosomes at once.

**Key words:** multiple myeloma, cytogenetic abnormalities, fluorescence in situ hybridization

## Введение

Множественная миелома (ММ) — злокачественная В-клеточная лимфоидная опухоль, характеризующаяся пролиферацией опухолевых плазматических клеток в костном мозге, за его пределами и наличием моноклонового белка (парапротеина) в крови и/или моче [1]. Парапротеин циркулирует в крови и может осаждаться в различных органах и тканях. Осажденный парапротеин может трансформироваться в амилоид (белок, устойчивый к разрушению), который нарушает функцию органов и систем. При ММ наблюдаются остеолитические поражения вследствие резорбции кости и нарушения образования остеобластов — молодых osteoобразующих клеток кости. При ММ возможно угнетение нормальных ростков кроветворения с развитием анемии, тромбоцитопении и лейкопении, что приводит, наряду с другими нарушениями, к ослаблению клеточного и гуморального иммунитета. Кроме того, важное значение имеет тот факт, что миелома, как злокачественная опухоль, развертывается в иммунокомпетентной системе.

В литературе обсуждаются 4 этапа развития (прогрессии) моноклональных плазмоклеточных заболеваний состояний [2]:

- моноклональная гаммапатия неясного генеза (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS)
- ↓
- тлеющая плазмоклеточная миелома
- ↓
- плазмоклеточная миелома
- ↓
- плазмоклеточный лейкоз.

MGUS характеризуется уровнем парапротеина в крови и/или моче  $< 30$  г/л, числом плазматических клеток в костном мозге  $< 10$  %, отсутствием повреж-

дения органов [3]. При тлеющей миеломе обнаруживается  $> 10$  % опухолевых клеток в костном мозге, содержание парапротеина  $\geq 30$  г/л, отсутствуют остеолитические повреждения, анемия и другие вторичные симптомы ММ [4]. Развитие плазмоклеточной миеломы с формированием экстрамедуллярных очагов поражения в различных органах и тканях, а также плазмоклеточный лейкоз как крайняя форма прогрессии опухоли характеризуют наиболее агрессивное течение болезни.

Все перечисленные клональные, плазмоклеточные, нозологически очерченные формы отражают 4 этапа опухолевой прогрессии и характеризуются весьма сложными хромосомными и молекулярно-генетическими нарушениями. Степень выраженности последних позволяет говорить о клональной эволюции генетических нарушений при ММ. Таким образом, обнаружение генетических поломок позволяет выделить различные клональные патологические процессы в сложной многоступенчатой модели прогрессии, которая начинается с MGUS и заканчивается плазмоклеточным лейкозом. Однако низкая пролиферативная активность опухолевых клеток на начальных этапах развития ММ — существенное ограничение для стандартного кариотипирования, поскольку анализ ограничивается только вступившими в метафазу клетками. Кроме того, некоторые хромосомные нарушения невозможно обнаружить методами стандартной цитогенетики (G-бэндинга) из-за чрезвычайно малых размеров поврежденных участков в хромосоме — так называемых скрытых хромосомных aberrаций. Все эти ограничения вполне преодолеваются популярным в клинике молекулярно-цитогенетическим методом — флуоресцентной *in situ* гибридизацией (FISH) во всех ее вариациях [5–13].

В период первичной диагностики ММ обнаруживаются различные хромосомные нарушения.

К ним относятся, например, гипердиплоидность за счет трисомии 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21-й хромосом, гиподиплоидность за счет моносомии хромосом, а также транслокации с вовлечением участков генов, кодирующих вариабельные области тяжелых цепей иммуноглобулинов – IGHV. Статус ploидности хромосомом и перестройка IGHV-генов – это 2 основных параметра, определяющих распределение больных в прогностические группы. Гиподиплоидный набор хромосомом, а также транслокации t(4;14)(p16;q32) и t(14;16)(q32;q23) определяют неблагоприятный прогноз при ММ [14, 15]. В то же время гипердиплоидный набор хромосомом, t(11;14)(q13;q32) характеризуют ММ с меньшим риском прогрессирования [16–18].

По мере прогрессирования болезни обычно возрастает пролиферативная активность опухолевых клеток и увеличивается число вторичных хромосомных нарушений. Они характеризуются del(13)(q14), del(17)(p13), del(1)(p36) и dup(1)(q21). Обозначенные участки хромосомом богаты генами, которые также связаны с клеточной пролиферацией и апоптозом. Показано, что вышеупомянутые нарушения имеют неблагоприятное прогностическое значение [15, 19, 20]. Нарушения в участках хромосомом 8q24, 11q13–q23, 14q32 наблюдаются в 15–20 % случаев ММ, однако их прогностическое значение не определено. Настоящая работа посвящена комплексной цитогенетической оценке хромосомных aberrаций у больных ММ как первому этапу реализации программы по изучению экспрессии раково-тестикулярных генов.

**Цель** настоящей работы заключается в сравнительном исследовании частоты, характера и клинической значимости хромосомных нарушений при ММ с использованием методов стандартной цитогенетики и FISH.

### Материалы и методы

#### Характеристика пациентов

Исследованы образцы аспирата костного мозга, полученные у 77 больных с диагнозом ММ, наблюдавшихся в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в 2016–2017 гг. Мужчин было 35 (45,5 %), женщин – 42 (54,5 %). Медиана возраста составила 53 года (разброс от 34 до 77 лет). Пациентов с первично установленным диагнозом было 43, в ремиссии – 27, с рецидивом/прогрессией болезни – 7. Больные с ММ были распределены согласно системе стадирования Дюри–Сальмон (IA стадия – 11 %, IIA – 8 %, IIIA – 62 %, IIIB – 19 %).

#### Культивирование и фиксация образцов костного мозга

Гепаринизированный аспират костного мозга был обработан согласно стандартной методике культивирования для дифференциального G-окрашивания

хромосомом. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки. Инкубацию осуществляли 24 и 48 ч при 37 °С. В «дневные» культуры за 40 мин до завершения инкубационного периода добавляли 80 мкл 0,25 % колхицина, в «ночные» культуры колхицин добавлялся одновременно с посадкой материала. Затем с целью гипотонии использовали раствор KCl при 37 °С и осуществляли несколько промывок фиксирующим раствором Карнуа (1/4 часть уксусной кислоты и 3/4 96 % метилового спирта). Суспензию клеток раскапывали на стекла над водяной баней. Окраску проводили 0,25 % раствором трипсина и красителем Гимза.

#### Цитогенетическое исследование

Анализировали не менее 20 метафаз. Для кариотипирования использовали полуавтоматическую программу IKAROS (MetaSystems). Кариотип описывали согласно требованиям международной системы номенклатуры хромосомом ISCN 2013. Стандартный хромосомный анализ был успешно проведен всем исследуемым больным.

Молекулярно-цитогенетический анализ FISH проводили согласно инструкции производителя (Kreatech). Технологически методика включает 5 этапов:

- 1) подготовка клеток;
- 2) предобработка клеток (2 × SSC, 70, 80 и 100 % этанол);
- 3) денатурация (5 мин при 75 °С);
- 4) гибридизация (1 ночь при 37 °С);
- 5) постгибридизационная отмывка (0,4 × SSC/0,3 % Twin 20, 2 × SSC/0,1 % Twin 20, 70, 80 и 100 % этанол).

Использовались зонды фирмы Kreatech IGH (14q32) Break, CCND/IGHt(11;14) Fusion, 11q23/DLEU1 (13q14), TP53(17p13)/ATM(11q22), 6q21/MYC(8q24), 1q21/SRD(1p36), FGFR3/IGHt(4;14) Fusion. Анализировали 100 клеток. Порог чувствительности – до 5 %.

#### Статистический анализ

В настоящем исследовании больные разделены на 2 группы. В 1-ю включены пациенты с хромосомными нарушениями ( $n = 20$ ), во 2-ю – без хромосомных аномалий ( $n = 57$ ). Согласно критерию Колмогорова–Смирнова количественные данные имели нормальное распределение. В связи с этим для дальнейшего статистического анализа использовались параметрические критерии. Для изучения корреляции хромосомных изменений с качественными параметрами применяли критерий  $\chi^2$ . Для анализа связи хромосомных аномалий с количественными параметрами (возраст больных, уровень лейкоцитов, гемоглобина, кальция, альбумина, креатинина и  $\beta_2$ -микроглобулина) использовали t-критерий. Общую

выживаемость анализировали по методу Каплана–Майера. Для построения кривой общей выживаемости продолжительность жизни рассчитывали от даты проведения цитогенетического исследования до летального исхода или даты последней информации о больном. Для сравнения показателей общей выживаемости у пациентов с хромосомными изменениями и без таковых использовали логранговый тест. Количественные данные представлены медианой значений и пограничными значениями в пределах доверительного интервала 0,95. Различия между группами считались статистически значимыми при значениях  $p < 0,05$ . Статистический анализ проводили с помощью программного пакета Statistica-10.

### Результаты

Клинические варианты ММ 77 больных, включенных в настоящее исследование, отражены в табл. 1. В табл. 2 показано число пациентов с хромосомными aberrациями и без них в зависимости от момента проведения исследования. У 76 из 77 больных описан нормальный кариотип (46, XX/46, XY). Множественные хромосомные нарушения обнаружены лишь у 1 пациентки с кариотипом: 46~49,XX,der(1)t(1;9)(p32;p24)del(1)(q12q24),der(3)t(3;7)(q29;q22),+4,der(6)t(6;20)(q12;q13),der(6)t(6;22)(q21;q1?)del(6)(p11),+del(6)(p21),del(8)(p21),der(9)t(1;9)(p32;p24),dup(9)(q3?2q34),+del(9)(q3),+11,der(12)ins(7;12)(p15;p13q24)del(7)(q10),del(12)(q12),+der(12)t(12;13)(p12;q14),14,+18,+18,der(1)t(1;19)(q22;q13)dup(1)(q22q25),der(20)t(1;20)(q21;p13),der(20)t(X;20;6;20)(q13;p12;p12;q13),i(21)(q10)[cp15].

Таблица 1. Клинические варианты ММ ( $n = 77$ )

| Клинический вариант ММ  | Число больных, $n$ (%) | Хромосомные нарушения (FISH), $n$ (%) |
|-------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| Симптоматическая        | 75 (97)                | 20 (26)                               |
| Тлеющая (бессимптомная) | 1 (1,5)                | 0                                     |
| Несекретирующая         | 1 (1,5)                | 0                                     |
| Всего                   | 77 (100)               | 20 (26)                               |

У 20 (26 %) из 77 больных ММ хромосомные нарушения обнаружены при помощи FISH-исследования. У больных с тлеющей и несекретирующей ММ aberrаций не выявлено. Среди 20 пациентов с хромосомными аномалиями 15 были с первичным диагнозом, 1 – с рецидивом и 4 – с прогрессированием ММ. У больных с хромосомными нарушениями имели место более поздние стадии ММ по Дюри–Сальмон, в ряде случаев отмечался

повышенный уровень креатинина ( $p = 0,0004$ ) и более низкий – гемоглобина ( $p = 0,03$ ) (табл. 3).

Таблица 2. Хромосомные нарушения в разных группах больных ММ ( $n = 77$ )

| Группа больных                     | Всего, $n$ (%) | С хромосомными изменениями, $n$ (%) |
|------------------------------------|----------------|-------------------------------------|
| С первично установленным диагнозом | 43 (100)       | 15 (35)                             |
| В ремиссии                         | 27 (100)       | 3 (11)                              |
| С рецидивом/прогрессивной болезнью | 7 (100)        | 2 (28)                              |

Наиболее частыми цитогенетическими нарушениями были dup(11)(q12–23) (35 %), del(13)(q14) (35 %), del(14)(q32) (25 %), dup(1)(q21) (20 %) и t(11;14) (15 %). Из 20 больных ММ у 14 (11 – первичные, 3 – с прогрессированием) хромосомные нарушения были комплексными (табл. 4).

Делеции различных участков большого числа хромосом возможны вследствие частичной или полной их моносомии (гиподиплоидии). Такие нарушения были обнаружены у 1 больного, которому FISH проводили повторно спустя 6 мес после первого исследования с отрицательным результатом (без хромосомных изменений). Продолжительность жизни пациента с t(11;14), делецией гена *IGHV* и делецией участка q14 хромосомы 13 составила всего 3 мес после установления диагноза ММ. У больной со сложным кариотипом при помощи FISH-анализа были выявлены делеции участков q14 хромосомы 13 и q24 хромосомы 8.

Наличие хромосомных аномалий сокращает сроки жизни больных и ухудшает показатели общей выживаемости в сравнении с пациентами без таковых ( $p = 0,00171$ ). Медиана общей выживаемости в группе с хромосомными изменениями составила 11,3 мес, при их отсутствии медиана не достигнута (см. рисунок).

### Обсуждение

Предполагается, что первичные нарушения происходят на ранних стадиях становления ММ, а вторичные на более поздних и поэтому ассоциируются с более агрессивным течением опухоли [21]. Многие первичные транслокации являются простыми реципрокными и связаны с онкогеном и с одним из энхансеров иммуноглобулинов. Такие транслокации опосредуются ошибками в 1 из 3 механизмов модификации ДНК В-клеток: синтез иммуноглобулиновых классов, что сопровождается ошибкой в соматической гипермутации, и, реже, VDJ-рекомбинация [22]. Как известно, транслокация с участием *IGHV*

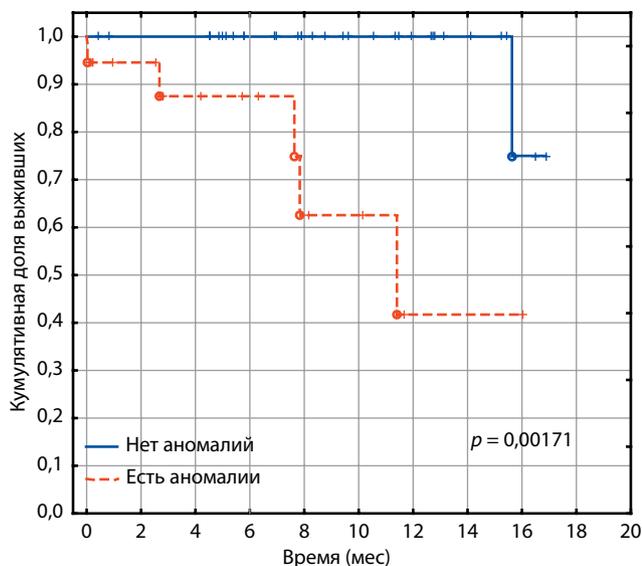
Таблица 3. Результаты FISH-исследования в группах больных с различными демографическими и клинико-гематологическими параметрами

| Показатель   | Всего       | Больные без хромосомных изменений | Больные с хромосомными изменениями | p      |
|--|-------------|-----------------------------------|------------------------------------|--------|
| Возраст, лет                                       | 53 (34–77)  | 56 (38–75)                        | 56 (34–77)                         | 0,594  |
| <b>Пол</b>   |             |                                   |                                    |        |
| Женщины  | 42 (54,5 %) | 32 (56,1 %)                       | 10 (50 %)                          | 0,635  |
| Мужчины  | 35 (45,5 %) | 25 (43,9 %)                       | 10 (50 %)                          |        |
| <b>Стадия по Дюри–Сальмон</b>                      |             |                                   |                                    |        |
| IA   | 9 (12 %)    | 9 (100 %)                         | 0                                  | 0,062  |
| IIA  | 6 (8 %)     | 6 (100 %)                         | 0                                  | 0,145  |
| IIIA   | 46 (61 %)   | 32 (69,5 %)                       | 14 (30,5 %)                        | 0,722  |
| IIIV   | 14 (19 %)   | 7 (50 %)                          | 7 (50 %)                           | 0,078  |
| <b>Тип тяжелой цепи</b>                            |             |                                   |                                    |        |
| IgG  | 47 (62,6 %) | 36 (76,5 %)                       | 11 (23,5 %)                        | 0,407  |
| IgA  | 10 (13,4 %) | 7 (70 %)                          | 3 (30 %)                           | 0,797  |
| Другие   | 18 (24 %)   | 12 (67 %)                         | 6 (33 %)                           | 0,463  |
| <b>Тип легкой цепи</b>                             |             |                                   |                                    |        |
| Каппа  | 46 (61,3 %) | 35 (76 %)                         | 11 (24 %)                          | 0,497  |
| Лямбда   | 29 (38,7 %) | 20 (69 %)                         | 9 (31 %)                           |        |
| <b>Уровень гемоглобина (г/дл)</b>                  |             |                                   |                                    |        |
| <8,5   | 17 (22 %)   | 10 (59 %)                         | 7 (41 %)                           | 0,030  |
| 8,5–10,0   | 11 (14 %)   | 8 (73 %)                          | 3 (27 %)                           |        |
| >10,0  | 46 (60 %)   | 36 (78 %)                         | 10 (22 %)                          |        |
| Нет данных   | 3 (4 %)     | –                                 | –                                  |        |
| <b>Уровень альбумина (г/л)</b>                     |             |                                   |                                    |        |
| <35  | 13 (17 %)   | 6 (46 %)                          | 7 (54 %)                           | 0,169  |
| ≥35  | 45 (58 %)   | 35 (78 %)                         | 10 (22 %)                          |        |
| Нет данных   | 19 (25 %)   | –                                 | –                                  |        |
| <b>Уровень креатинина (мкмоль/л)</b>               |             |                                   |                                    |        |
| ≤110   | 55 (71 %)   | 45 (82 %)                         | 10 (18 %)                          | 0,0004 |
| >110   | 16 (21 %)   | 6 (38 %)                          | 10 (62 %)                          |        |
| Нет данных   | 6 (8 %)     | –                                 | –                                  |        |
| <b>Уровень кальция (ммоль/л)</b>                   |             |                                   |                                    |        |
| ≤2,5   | 42 (54,5 %) | 32 (76 %)                         | 10 (24 %)                          | 0,183  |
| >2,5   | 17 (22 %)   | 11 (65 %)                         | 6 (35 %)                           |        |
| Нет данных   | 18 (23,5 %) | –                                 | –                                  |        |
| <b>Уровень лактатдегидрогеназы (Е/л)</b>           |             |                                   |                                    |        |
| ≤450   | 49 (64 %)   | 34 (69 %)                         | 15 (31 %)                          | 0,818  |
| >450   | 10 (13 %)   | 6 (60 %)                          | 4 (40 %)                           |        |
| Нет данных   | 18 (23 %)   | –                                 | –                                  |        |
| <b>Уровень β<sub>2</sub>-микроглобулина (мг/л)</b> |             |                                   |                                    |        |
| <3,5   | 19 (25 %)   | 16 (84 %)                         | 3 (16 %)                           | 0,100  |
| 3,5–5,5  | 12 (16 %)   | 8 (67 %)                          | 3 (33 %)                           |        |
| >5,5   | 9 (12 %)    | 5 (55,5 %)                        | 4 (44,5 %)                         |        |
| Нет данных   | 37 (48 %)   | –                                 | –                                  |        |

Таблица 4. Хромосомные нарушения, обнаруженные методом FISH у больных ММ (n = 20)

| Название зонда и выявленные изменения в клетке | Больные, получающие лечение |   |   |   |   | Первичные больные |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|--|-----------------------------|---|---|---|---|-------------------|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|  | 1                           | 2 | 3 | 4 | 5 | 6                 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| <b>IGH (14q32) Break</b>                       |                             |   |   |   |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| (IGHx1)  |                             |   |   | ■ |   | ■                 |   | ■ | ■ | ■  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| t(?;14)  |                             |   |   |   |   |                   |   |   |   | ■  |    |    | ■  |    |    |    |    |    |    | ■  |
| <b>FGFR3/IGH t(4;14) Fusion</b>                |                             |   |   |   |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| t(4;14)  |                             |   |   |   |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    | ■  | ■  |    |
| (FGFR3x1)                                      |                             |   |   | ■ |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| t(4;?;14)                                      |                             | ■ |   |   |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| <b>CCND1/IGH t(11;14) Fusion</b>               |                             |   |   |   |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| t(11;14)                                       |                             |   |   |   |   |                   |   |   | ■ |    | ■  | ■  |    |    |    |    |    |    |    |    |
| <b>TP53 (17p13)/ATM (11q22)</b>                |                             |   |   |   |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| (TP53x3)                                       |                             |   |   |   |   |                   |   |   |   |    |    |    |    | ■  |    |    |    |    |    |    |
| (TP53x4)                                       |                             |   |   |   |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    | ■  |    |    |
| (TP53x1)                                       |                             |   |   | ■ |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | ■  |
| <b>6q21/MYC (8q24)</b>                         |                             |   |   |   |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| (MYCx3)  |                             |   |   |   |   |                   |   |   | ■ |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| (MYCx1)  |                             |   | ■ | ■ |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| (6q21x3)                                       |                             |   |   |   |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    | ■  |    |    |
| (6q21x1)                                       |                             |   |   | ■ |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| <b>1q21/SRD (1p36)</b>                         |                             |   |   |   |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| (1q21x3)                                       | ■                           |   |   |   |   |                   |   |   |   |    | ■  |    |    | ■  |    |    |    |    |    |    |
| (1q21x4)                                       |                             |   |   |   |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    | ■  |    |
| (SRDx1)  |                             |   |   | ■ |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| (1q21x1)                                       |                             |   |   | ■ |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| <b>MM 11q23/DLEU (13q14)</b>                   |                             |   |   |   |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| (11q12–q23x3)                                  | ■                           |   |   |   |   |                   |   | ■ | ■ |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| (11q12–q23x4)                                  |                             |   |   |   |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    | ■  |    |
| (11q23x3)                                      |                             |   | ■ |   | ■ |                   |   |   |   |    |    |    |    |    | ■  |    |    |    |    |    |
| (11q23x4)                                      |                             |   |   |   |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    | ■  |    |    |    |    |    |
| (11q23x1)                                      |                             |   |   |   |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | ■  |
| (DLEUXx1)                                      | ■                           |   | ■ | ■ |   |                   |   | ■ |   | ■  |    |    |    |    |    | ■  |    |    |    | ■  |
| (DLEUXx4)                                      |                             |   |   |   |   |                   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    | ■  |    |

**Примечание.** Выделенные цветом ячейки обозначают наличие того или иного хромосомного нарушения; в скобках указан ген или регион хромосомы с количеством сигналов, обнаруженных в одной интерфазной клетке; t – транслокация.



Общая выживаемость больных ММ с хромосомными нарушениями ( $n = 20$ ) и без таковых ( $n = 57$ )

увеличивает возможность прогрессирования болезни от 50 % при MGUS и до 90 % в клеточных линиях миеломы человека [22, 23]. В нашем исследовании транслокация  $t(11;14)$  выявлена у 3 первичных больных (4 %). Интересно отметить, что у одного из них данное нарушение обнаружено совместно с потерей одной из деривативных хромосом, с делецией участка  $q32$  хромосомы 14 (возможно, моносомия 14) и делецией участка  $q14$  хромосомы 13. Продолжительность жизни больного составила 3 мес после установления диагноза ММ. У другого больного с  $t(11;14)$  наблюдается дополнительная деривативная хромосома от транслокации  $t(11;14)$ , у третьего – дополнительная деривативная хромосома от транслокации  $t(11;14)$  и частичная трисомия участка  $q21$  хромосомы 1. Транслокация  $t(4;14)(p16;q32)$  имела место у 3 больных (15 %). Данная транслокация включает 2 белок-кодирующих гена, которые располагаются на участке  $p16$  хромосомы 4. Первый ген – *MMSET* (SET-домен ММ), его белок гомологичен гистону метилтрансфераз. Второй ген – *FGFR3* (рецептор 3 фактора роста фибробластов), онкогенный рецептор тирозинкиназы [21]. Как было упомянуто ранее,  $t(4;14)(p16;q32)$  является криптическим цитогенетическим нарушением, которое можно обнаружить, только с помощью FISH или полимеразной цепной реакции. Транслокация  $t(4;14)$  тесно связана с моносомией хромосомы 13 или делецией длинного плеча хромосомы 13 и обычно указывает на низкие показатели выживаемости больных [15, 24–26]. Данное сочетание в нашей когорте встретилось только у 1 больного. У других же 2 пациентов  $t(4;14)$  обнаружена как единственное нарушение. В настоящей работе одним из наиболее часто встречающихся нарушений оказалась делеция региона  $q32$  хромосо-

мы 14 – гена *IGHV*. Она имела место у 4 первичных больных и у 1 пациента на фоне противоопухолевого лечения. У первичных больных помимо делеции гена *IGHV* наблюдались дупликации участков  $q24$  и  $q12-q23$  хромосом 8 и 11 соответственно,  $t(11;14)$  и дополнительная деривативная хромосома от этой же транслокации, перестройки генов *IGHV*; также она встречалась как единственное нарушение. У больного с делецией гена *IGHV*, находящегося на терапии, обнаружены делеции различных участков большого числа хромосом, что возможно вследствие частичной или полной моносомии хромосом (гиподиплоидии). Пациент оказался резистентным к терапии и умер спустя месяц после проведения FISH-исследования.

Как показывают ранние публикации, при  $-13/13q$  наблюдается гиперэкспрессия опухолевого супрессора RB1, что может приводить к снижению регуляции клеточного цикла опухолевых клеток [27]. В нашем исследовании  $del(13)(q14)$  встречается у 7 (35 %) больных (4 – первичные, 3 – с прогрессированием). У первичных больных одновременно с  $del(13)(q14)$  встречаются: дупликация участка  $q12-q23$  хромосомы 11,  $t(11;14)$ , дупликация участка  $q21$  хромосомы 6. Больные с такими дополнительными нарушениями хорошо поддаются противоопухолевому лечению и достигают состояния стабилизации. В то же время у пациента с  $del(13)(q14)$ , потерей участков  $p13$  и  $q23$  хромосом 17 и 11 соответственно, а также наличием  $t(4;14)$  заболевание характеризовалось агрессивным течением [15–18, 26, 28]. У 2 больных с  $del(13)(q14)$ , получающих терапию, наблюдались делеции участков большого числа хромосом, что резко ухудшает прогноз. Только у одной из этих больных было обнаружено множество хромосомных нарушений при помощи стандартного кариотипирования. Пациентка умерла через 3 мес после цитогенетического исследования. Увеличение числа копий  $q21$  хромосомы 1 встречается у 35–40 % больных ММ и часто совпадает с делецией  $p36$  хромосомы 1, которое наблюдается в 30 % случаев. Оба нарушения связаны с плохим прогнозом [19, 29–32]. Увеличение числа копий участка  $q21$  хромосомы 1 не совпало с  $del(1)(p36)$  ни у одного больного. Однако в 1 наблюдении в процессе лечения обнаруживались  $del(1)(p36)$  и  $del(1)(q21)$ , а пациент оказался резистентным к терапии и с агрессивным течением болезни.

Гемизиготная делеция хромосомы 17 и делеция  $p$ -плеча встречается у 10 % первичных больных на более поздних стадиях болезни [15, 33, 34]. На коротком плече хромосомы 17 расположен ген опухолевой супрессии *TP53*. Показано, что при ММ делеция лишь гена *TP53* встречается менее чем в 1 %, а делеция  $17p13$  наблюдается в 25–37 % случаев. Ген *TP53* принимает участие в регуляции транскрипции, репарации ДНК и апоптозе. При ММ  $del(17)(p13)$

связана с агрессивным фенотипом болезни, экстрамедуллярным распространением и худшей выживаемостью [35–39]. В нашей работе делеция участка p13 хромосомы 17 обнаружена в составе сложных кариотипов у 2 больных, что указывает на более позднюю стадию заболевания с агрессивным течением.

У единственной больной с множеством хромосомных aberrаций, выявленных с помощью G-бэндинга при кариотипировании, одновременно проведено исследование методом FISH. При этом обнаружены частичная трисомия участка q12->q23 хромосомы 11, делеция участка q24 хромосомы 8, делеция участка q14 хромосомы 13, что может указывать на более поздние этапы течения заболевания. Больная умерла через 3 мес после повторного обследования, продолжительность жизни от времени установления диагноза составила 7 лет. Известно, что при обнаружении хромосомных нарушений методом дифференциальной окраски в делящихся клетках MM отличается агрессивным течением и неблагоприятным прогнозом.

### Заключение

В настоящей работе были проведены стандартное цитогенетическое исследование и FISH-анализ 77 больным с MM. У 20 из них хромосомные нарушения обнаружены FISH-исследованием и лишь у 1 пациента хромосомные изменения были также зафиксированы при помощи стандартного кариотипирования. Хромосомные изменения, приводящие к потере участков хромосом, имели более неблагоприятный прогноз с общей продолжительностью жизни больных 3–6 мес. Таким образом, FISH-исследование позволило идентифицировать нарушения, которые либо присутствовали только в неделящихся интерфазных клетках, либо существовали как субмикроскопические aberrации. Однако нельзя пренебрегать исследованием кариотипа методом дифференциального окрашивания (G-бэндинг), который позволяет увидеть нарушения всех хромосом в отличие от локус-специфичного FISH-анализа.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2017. P. 243.
2. Morgan G.J., Walker B.A., Davies F.E. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* 2012;12(5):335–48. DOI: 10.1038/nrc3257. PMID: 22495321.
3. Kyle R.A., Durie B.G., Rajkumar S.V. et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* 2010;24(6):1121–7. DOI: 10.1038/leu.2010.60. PMID: 20410922.
4. Kyle R.A., Remstein E.D., Therneau T.M. et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *New Engl J Med* 2007;356(25):2582–90. DOI: 10.1056/NEJMoa070389. PMID: 17582068.
5. Langer P.R., Waldrop A.A., Ward D.C. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78(11):6633–7. PMID: 6273878.
6. Luke S., Shepelsky M. FISH: recent advances and diagnostic aspects. *Cell Vis* 1998;5(1):49–53. PMID: 9660726.
7. Csaki A., Garwe F., Steinbrück A. et al. A parallel approach for subwavelength molecular surgery using gene-specific positioned metal nanoparticles as laser light antennas. *Nano Lett* 2007;7(2):247–53. DOI: 10.1021/nl061966x. PMID: 17249738.
8. Schröck E., du Manoir S., Veldman T. et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996;273:494–7. PMID: 8662537.
9. Speicher M.R., Gwyn Ballard S., Ward D.C. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996;12(4):368–75. DOI: 10.1038/ng0496-368. PMID: 8630489.
10. Liehr T., Pellestor F. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), chapter Molecular Cytogenetics: The Standard FISH and PRINS Procedure. 2009. Pp. 23–34.
11. Guan X.Y., Trent J.M., Meltzer P.S. Generation of band-specific painting probes from a single microdissected chromosome. *Hum Mol Genet* 1993;2(8):1117–21. PMID: 8401492.
12. Guan X.Y., Zhang H., Bittner M. et al. Chromosome arm painting probes. *Nat Genet* 1996;12(1):10–1. DOI: 10.1038/ng0196-10. PMID: 8528238.
13. Pinkel D., Straume T., Gray J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83(9):2934–8. PMID: 3458254.
14. Smadja N.V., Bastard C., Brigaudeau C. et al. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2001;98(7):2229–38. PMID: 11568011.
15. Fonseca R., Blood E., Rue M. et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 2003;101(11):4569–75. DOI: 10.1182/blood-2002-10-3017. PMID: 12576322.
16. Bergsagel P.L., Kuehl W.M. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23(26):6333–8. DOI: 10.1200/JCO.2005.05.021. PMID: 16155016.
17. Fonseca R., Bergsagel P.L., Drach J. et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009;23(12):2210–21. DOI: 10.1038/leu.2009.174. PMID: 19798094.
18. Fonseca R., Blood E.A., Oken M.M. et al. Myeloma and the t(11;14) (q13;q32): evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood* 2002;99(10):3735–41. PMID: 11986230.
19. Walker B.A., Leone P.E., Chiecchio L. et al. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood* 2010;116(15):e56–65. DOI: 10.1182/blood-2010-04-279596. PMID: 20616218.
20. Tricot G., Barlogie B., Jagannath S. et al. Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or

- complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities. *Blood* 1995;86(11):4250–6. PMID: 7492784.
21. Kuehl W.M., Bergsagel P.L. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2002;2(3):175–87. DOI: 10.1038/nrc746. PMID: 11990854.
  22. Bergsagel P.L., Kuehl W.M. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene* 2001;20(40):5611–22. DOI: 10.1038/sj.onc.1204641. PMID: 11607813.
  23. Bergsagel P.L., Chesi M., Nardini E. et al. Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(24):13931–6. PMID: 8943038.
  24. Keats J.J., Reiman T., Maxwell C.A. et al. In multiple myeloma t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood* 2003;101(4):1520–9. DOI: 10.1182/blood-2002-06-1675. PMID: 12393535.
  25. Gertz M.A., Lacy M.Q., Dispenzieri A. et al. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood* 2005;106(8):2837–40. DOI: 10.1182/blood-2005-04-1411. PMID: 15976175.
  26. Avet-Loiseau H., Attal M., Moreau P. et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood* 2007;109(8):3489–95. DOI: 10.1182/blood-2006-08-040410. PMID: 17209057.
  27. Elhenaï M.O., Hamoudi R.A., Swansbury J. et al. Delineation of the minimal region of loss at 13q14 in multiple myeloma. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;36(1):99–106. DOI: 10.1002/gcc.10140. PMID: 12461754.
  28. Drach J., Ackermann J., Fritz E. et al. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood* 1998;92(3):802–9. PMID: 9680348.
  29. Qazilbash M.H., Saliba R.M., Ahmed B. et al. Deletion of the short arm of chromosome 1 (del 1p) is a strong predictor of poor outcome in myeloma patients undergoing an autotransplant. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13(9):1066–72. DOI: 10.1016/j.bbmt.2007.05.014. PMID: 17697969.
  30. Wu K.L., Beverloo B., Lokhorst H.M. et al. Abnormalities of chromosome 1p/q are highly associated with chromosome 13/13q deletions and are an adverse prognostic factor of the outcome of high-dose chemotherapy in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 2007;136(4):615–23. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2006.06481.x. PMID: 17223915.
  31. Chang H., Ning Y., Qi X. et al. Chromosome 1p21 deletion is a novel prognostic marker in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 2007;139(1):51–4. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06750.x. PMID: 17854306.
  32. Hanamura I., Stewart J.P., Huang Y. et al. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood* 2006;108(5):1724–32. DOI: 10.1182/blood-2006-03-009910. PMID: 16705089.
  33. Avet-Loiseau H., Li J.Y., Godon C. et al. P53 deletion is not a frequent event in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1999;106(3):717–9. PMID: 10468863.
  34. Liebisch P., Wendl C., Wellmann A. et al. High incidence of trisomies 1q, 9q, and 11q in multiple myeloma: results from a comprehensive molecular cytogenetic analysis. *Leukemia* 2003;17(12):2535–7. DOI: 10.1038/sj.leu.2403153. PMID: 14523465.
  35. Chang H., Qi C., Yi Q.L. et al. p53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation. *Blood* 2005;105(1):358–60. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1363. PMID: 15339849.
  36. Mazars G.R., Portier M., Zhang X.G. et al. Mutations of the p53 gene in human myeloma cell lines. *Oncogene* 1992;7(5):1015–8. PMID: 1373872.
  37. Corradini P., Inghirami G., Astolfi M. et al. Inactivation of tumor suppressor genes, p53 and Rb1, in plasma cell dyscrasias. *Leukemia* 1994;8(5):758–67. PMID: 8182933.
  38. Neri A., Baldini L., Trecca D. et al. p53 gene mutations in multiple myeloma are associated with advanced forms of malignancy. *Blood* 1993;81(1):128–35. PMID: 8417784.
  39. Preudhomme C., Facon T., Zandeck M. et al. Rare occurrence of p53 gene mutations in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1992;81(3):440–3. PMID: 1390218.

#### Вклад авторов

А.А. Солодовник: концепция и дизайн, сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи;  
 А.С. Мкртчян: концепция и дизайн, сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи;  
 В.А. Мисюрин: концепция и дизайн, сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных;  
 Л.А. Кесаева: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных;  
 Н.Н. Касаткина: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных;  
 О.М. Вотякова: предоставление материалов исследования;  
 О.Ю. Якимович: предоставление материалов исследования;  
 Е.Г. Медведовская: предоставление материалов исследования;  
 А.С. Антипова: предоставление материалов исследования;  
 И.З. Заводнова: предоставление материалов исследования;  
 О.А. Коломейцев: предоставление материалов исследования;  
 А.Д. Ширин: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, подготовка рукописи;  
 Е.А. Османов: концепция и дизайн, предоставление материалов исследования, подготовка рукописи;  
 А.В. Мисюрин: концепция и дизайн, сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи.

**Authors' contributions**

A.A. Solodovnik: concept and design, data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation, article preparation;  
A.S. Mkrтчyan: concept and design, data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation, article preparation;  
V.A. Misyurin: concept and design, data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation;  
L.A. Kesaeva: data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation;  
N.N. Kasatkina: data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation;  
O.M. Votyakova: provision of study materials;  
O.Yu. Yakimovich: provision of study materials;  
E.G. Medvedovskaya: provision of study materials;  
A.S. Antipova: provision of study materials;  
I.Z. Zavodnova: provision of study materials;  
O.A. Kolomeytsev: provision of study materials;  
A.D. Shirin: data collection and processing, provision of study materials, article preparation;  
E.A. Osmanov: concept and design, provision of study materials, article preparation;  
A.V. Misyurin: concept and design, data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation, article preparation.

**ORCID авторов/ORCID of authors**

A.A. Солодовник/A.A. Solodovnik: <https://orcid.org/0000-0001-8399-057X>  
A.S. Мкртчян/A.S. Mkrтчyan: <https://orcid.org/0000-0002-0638-213X>  
В.А. Мисюрин/V.A. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0002-0762-5631>  
Л.А. Кесаева/L.A. Kesaeva: <https://orcid.org/0000-0001-8277-8649>  
Н.Н. Касаткина/N.N. Kasatkina: <https://orcid.org/0000-0002-4735-977X>  
О.А. Коломейцев/O.A. Kolomeytsev: <https://orcid.org/0000-0003-3430-8540>  
А.С. Антипова/A.S. Antipova: <https://orcid.org/0000-0002-1731-8336>  
И.З. Заводнова/I.Z. Zavodnova: <https://orcid.org/0000-0001-6674-8634>  
Е.Г. Медведовская/E.G. Medvedovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-4309-2473>  
А.Д. Ширин/A.D. Shirin: <https://orcid.org/0000-0003-3244-7774>  
Е.А. Османов/E.A. Osmanov: <https://orcid.org/0000-0002-3067-1601>  
А.В. Мисюрин/A.V. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0003-1349-2879>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность ООО «ГеноТехнология», при поддержке которого была выполнена настоящая работа.  
**Acknowledgments.** Authors would like to thank LLC GeneTechnology for supporting this research.

## СИГНАЛЬНЫЕ TLR/RLR-МЕХАНИЗМЫ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ ИНГАВИРИН И ТИМОГЕН

Т.М. Соколова<sup>1</sup>, В.В. Полосков<sup>1</sup>, А.Н. Шувалов<sup>1</sup>, О.С. Бурова<sup>2</sup>, З.А. Соколова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России;  
Россия, 123098 Москва, ул. Гамалеи, 18;

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

**Контакты:** Татьяна Михайловна Соколова [tsokolovavir@mail.ru](mailto:tsokolovavir@mail.ru)

**Цель работы** – изучить препараты ингавирина и тимогена как активаторы сигнальных TLR- и RLR-реакций в чувствительной клеточной модели моноцитов THP-1 и клетках крови доноров.

**Материалы и методы.** Исследованы препараты ингавирина (имидазолилэтанамид пентандиовой кислоты – 6-[2-(1H-imidazol-4-yl)ethylamino]-5-oxohexanoic acid; «Валента Фармацевтика», Россия) и тимоген (альфа-глутамил-триптофан; «Цитомед», Россия), зарегистрированные в России как лекарственные препараты. Определяли экспрессию генов TLR/RLR-рецепторов под действием препаратов ингавирина 50–300 мкг/мл и тимогена 0,1–5 мкг/мл (24 ч при 37 °С) методом количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Уровень цитокинов жидкости оценивали с помощью наборов для иммуноферментного анализа (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) в культуральной жидкости. Трансфекцию малой ингибиторной РНК (миРНК) MAVS проводили с помощью реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Иммунофенотип клеток линии THP-1 определяли проточной цитометрией с мечеными моноклональными антителами FITC CD14 и PE CD34 (BD Biosciences) на приборе FACSCanto II (Becton Dickinson).

**Результаты.** Впервые показано, что препараты ингавирина (имидазолилэтанамид пентандиовой кислоты) и тимоген (альфа-глутамил-триптофан) – активаторы генов иммунных TLR/RLR-рецепторов и их сигнальных факторов в клеточной линии THP-1 (моноцитарная лейкемия человека) и крови здоровых доноров. В этих клеточных системах препараты ингавирина и тимоген вызывали похожие иммунные реакции и стимулировали экспрессию генов: эндосомальных рецепторов TLR 3, 7, 8, 9, цитоплазматических сенсоров RIG1/MDA5 и сигнальных факторов NFκB1 и MAVS. Индуцированные клетки секретировали воспалительные цитокины TNF-α и IL1-β. Ингавирин в клеточной линии THP-1 вызывал снижение бластных клеток CD34<sup>+</sup>. Активация ингавирином генов MAVS и ко-рецептора B2M главного комплекса гистосовместимости (MHCII) были взаимосвязаны. Трансфекция миРНК MAVS снижала уровень гомологичной мРНК и гетерологичной мРНК B2M.

**Заключение.** Полученные результаты дают основание считать, что противовирусные и иммуномодулирующие свойства препаратов ингавирина и тимогена связаны с активацией группы генов TLR/RLR-сигнальных путей врожденного и адаптивного иммунитета и дифференцировкой предшественников гемопоэтических клеток.

**Ключевые слова:** ингавирин, тимоген, THP-1, TLR/RLR, MAVS

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-60-66

### SIGNALING TLR/RLR-MECHANISMS OF IMMUNOMODULATING ACTION OF INGAVIRIN AND THYMOGEN PREPARATIONS

T.M. Sokolova<sup>1</sup>, V.V. Poloskov<sup>1</sup>, A.N. Shuvalov<sup>1</sup>, O.S. Burova<sup>2</sup>, Z.A. Sokolova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Health of the Russian Federation;  
18 Gamalei St., Moscow 123098, Russia;

<sup>2</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation;  
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

**Objective:** to study drugs ingavirin and thymogen as activators of signal TLR and RLR reactions in a sensitive cell model of THP-1 monocytes and blood cells of donors.

**Materials and methods.** Investigated drugs ingavirin (imidazolethyanamide pentanedioic acid – 6-[2-(1H-imidazol-4-yl)ethylamino]-5-oxohexanoic acid; Valenta Pharmaceuticals, Russia) and thymogen (alpha-glutamyl-tryptophan; Cytomed, Russia), registered in Russia as medicines. The expression of TLR/RLR receptor genes was determined under the action of ingavirin 50–300 µg/ml and thymogen 0.1–5 µg/ml (24 h, 37 °C) using quantitative RT-PCR. The level of fluid cytokines was determined using ELISA kits (Vector-Best, Russia) in the culture fluid. Transfection of small inhibitory RNA (siRNA) MAVS was performed using the reagent Lipofectamine 2000 (Invitrogen). The immunophenotype of the THP-1 cell line was determined by flow cytometry with labeled monoclonal antibodies FITC CD14 and PE CD34 (BD Biosciences) on a FACSCanto II instrument (Becton Dickinson).

**Results.** For the first time, it has been shown that ingavirin (imidazolethyanamide) and thymogen (dipeptide Glu-Trp) preparations are activators of the immune TLR/RLR receptors and their signaling factors genes in the cultures of monocytic leukemia THP-1 and blood of healthy donors. In these cellular systems, ingavirin and thymogen preparations elicited similar immune responses and stimulated the expression of genes: endosomal TLR3/7/8/9 receptors, RIG1/MDA5 cytoplasmic sensors and NFκB1 and MAVS signaling factors. Induced cells secrete inflammatory cytokines of TNF-α and IL1-β. Ingavirin in THP-1 cell culture monocytes caused a decrease in CD34<sup>+</sup> blast cells. Activation the genes of MAVS and co-receptor B2M of the main histocompatibility complex (MHCII) by ingavirin were interrelated. Transfection of siRNA MAVS reduced the level of homologous mRNA MAVS and heterologous mRNA B2M.

**Conclusion.** The results obtained suggest that the antiviral and immunomodulating properties of the drugs ingavirin and thymogen are associated with the activation of a group of TLR/RLR signaling pathways of the innate and adaptive immunity and the differentiation of hematopoietic cell precursors.

**Key words:** ingavirin, timogen, THP-1, blood, TLR/RLR, MAVS

## Введение

TLRs и RLRs являются семейством сигнальных рецепторов врожденного иммунитета, которые были открыты как структуры, распознающие патогены [1, 2]. В дальнейшем было показано участие этих рецепторов в клеточной дифференцировке [3]. Рецепторы TLR 3, 7, 8, 9 локализованы в эндосомах, и их специфические агонисты известны. TLR3 взаимодействуют с двуспиральными РНК (дсРНК), TLR7/8 – с односпиральными РНК (осРНК) и TLR9 – с CpG-олигонуклеотидами. Внутриклеточные дсРНК и осРНК также узнаются хеликазами RIG-I и MDA5, которые взаимодействуют с митохондриальным сигнальным белком MAVS. RIG-зависимый путь активации генов воспалительных цитокинов и интерферона (ИФН) осуществляется с участием транскрипционных факторов NFκB1 и IRF3 и 7 [4].

В ряде публикаций описаны лечебные эффекты отечественных препаратов ингавирин (дикарбамин) и тимоген при вирусных и онкологических заболеваниях [5–7]. Для дальнейшего продвижения отечественных препаратов ингавирин и тимоген в клинику необходимо углубленное изучение механизмов их действия на сигнальные реакции TLRs и RLRs – рецепторов врожденного иммунитета.

Ингавирин по химической структуре, как и зарубежный препарат имиквимод, относится к группе имидазолхинолинов [8, 9]. На основе имидазольных соединений синтезирован ряд медицинских препаратов, которые обладают противоопухолевой активностью и являются агонистами родственных рецепторов TLR 7, 8, 9 [10]. Изучение препарата ингавирин как TLR-агониста в клетках крови доноров показало стимуляцию им гена рецептора TLR7 и генов ИФН-зависимых белков Mx1 и OAS1 [11]. В условиях гриппозной инфекции ингавирин повышал чувствительность клеток к ИФН типа 1 [12] и влиял на ядерный транспорт и свойства вирусного нуклеопротеина [13].

В последнее время появились сообщения о пептидах тимуса как регуляторах генной экспрессии [14]. Гормон тимозин-α<sub>1</sub> известен как эффективный

иммунный регулятор и агонист рецепторов TLR9 и TLR2 [15]. В комбинации с цитокинами и химиотерапией гормон применяется в онкологии [16]. Другой гормон, тималин, является регулятором воспалительных реакций у мышей и сигнальных реакций макрофагов [17]. Иммунобиологические активности дипептида тимогена во многом напоминают выявленные у гормона тимозина-α<sub>1</sub> [18]. Тимоген стимулирует пролиферацию и дифференцировку Т-лимфоцитов, усиливает активность нейтрофилов, моноцитов и NK-клеток, проявляет гемостимулирующие эффекты и позитивно влияет на развитие клеток костного мозга [19]. Иммуностимулирующее действие ингавирина и тимогена в дендритных клетках и макрофагах осуществляется с участием TLR-сигнальных реакций и проявляется усилением их противоопухолевой киллерной активности [15, 20].

**Цель работы** – изучить препараты ингавирин и тимоген как активаторы сигнальных TLR- и RLR-реакций в чувствительной клеточной модели моноцитов THP-1 [21]. Сопоставлены эффекты в клетках линии THP-1 моноцитарного лейкоза и клетках крови здоровых доноров. Результаты с ингавирином и тимогеном дополняют информацию о препаратах ИФН и ИФН-индукторов как активаторах TLR/RLR-генов, вызывающих дифференцировку моноцитов THP-1 [22].

## Материалы и методы

**Препараты.** Ингавирин (имидазолилэтанамида пентандиовой кислоты) – 6-[2-(1H-Imidazol-4-yl)ethylamino]-5-oxohexanoic acid, капсулы 90 мг, «Валента Фармацевтика» (Россия). Тимоген (альфа-глутамил-триптофан), ампула 100 мкг/мл, ЗАО «Медико-биологический научно-производственный комплекс «Цитомед» (Россия). Зарегистрированы в России как лекарственные препараты. Препараты исследованы в концентрациях, не оказывающих влияния на жизнеспособность клеток: ингавирин – 50–300 мкг/мл, тимоген – 0,1–5 мкг/мл. Время инкубации клеток с препаратами – 24 ч при 37 °С.

**Клеточные культуры.** Кровь здоровых доноров разводили в 3–5 раз в среде RPMI-1640 с глутамином, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и антибиотики. Клетки линии ТНР-1 (острый моноцитарный лейкоз, ATCC cat. No. TIB-202) культивировали в среде RPMI-1640 с глутамином и 10 % ЭТС, пересевы суспензии клеток делали в концентрации 200 тыс./мл на 2–3-и сутки.

**Трансфекция малой ингибиторной РНК (миРНК) MAVS в клетки ТНР-1.** Использовали структуру миРНК MAVS, изученную в экспериментах на специфичность и опубликованную ранее [23]. Плюс-нить 5'-uugcugaagacaagaccuaa-3'tt и комплементарная минус-нить 3'-ttaacgacuuucuguaau-5' длиной в 21 нуклеотид. Олигорибонуклеотиды синтезированы фирмой «Синтол» (Россия). Комплексование плюс- и минус-нитей РНК делали методикой гибридизации [24].

Трансфекцию миРНК MAVS проводили с помощью реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat. No. 1254160) согласно протоколу производителя в редуцированной питательной среде Opti-MEM (cat. No. 31985–062). Смешивали 200 мкл миРНК ~0,5 ОЕ/мл и Lipofectamine в отношении 1:1 в среде Opti-MEM и оставляли на 5 мин при 20 °С. В контроле вместо миРНК использовали 200 мкл среды Opti-MEM. К приготовленным пробам добавляли клетки ТНР-1 в количестве 2 мл с концентрацией  $10^6$ /мл и инкубировали 24 ч при 37 °С. Затем контрольные и трансфецированные миРНК клетки осаждали, отмывали и в концентрации  $5 \times 10^5$ /мл обрабатывали препаратом ингавирин в среде RPMI-1640 с 5 % ЭТС. Жизнеспособность клеток составляла 80–90 % по окраске трипановым синим.

**Количественный анализ мРНК.** Суммарную РНК выделяли из опытных и контрольных клеток с реагентом PureZol (Bio-Rad, США) и обрабатывали ДНКазой для удаления примесей ДНК (набор RNA-free, Ambion, США). Реакцию обратной транскрипции (ОТ) ставили с универсальными праймерами random и олиго(dT)<sub>15</sub> в объеме 30 мкл при 42 °С 1 ч. Смешивали 5 мкл РНК с 2 мкл праймеров (1 ОЕ/мл) и нагревали 5 мин при 90 °С. К РНК добавляли 23 мкл реакционной смеси, содержащей 4 вида dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) по 500 мкМ, фермент обратную транскриптазу (RT MMLV) 300 ед, ингибитор РНКазы (RNAsin) 50 ед (все реактивы фирмы Promega, США). Реакцию ОТ останавливали нагреванием проб до 95 °С.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) проводили на амплификаторе CFX-96 с готовой 2-кратной смесью SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, США) в микропробирках 0,2 мл. Смешивали 2 мкл специфических пар праймеров (прямой и обратный) с 3 мкл кДНК

(разведения 2–100 раз) и 5 мкл 2-кратной смеси SsoFast EvaGreen Supermix. Каждая проба исследовалась в 3 повторах. Программа ПЦР: 96 °С 2 мин (1 цикл), далее 50–55 циклов 94 °С 10 с, 55–60 °С 20 с, 72 °С 30 с. Программа плавления в конечной точке 65–95 °С, шаг 0,5 °С 10 с. Количество ДНК-амплификатов оценивали по пороговым циклам (Cq). Обработка данных амплификации выполнена в программе CFX Manager Software «Gene expression analysis» (Bio-Rad, США) в автоматическом режиме. Определены стандартные отклонения и изменения уровней в опытных пробах (дельта Cq  $\pm$  SD) относительно контроля. Достоверность различий в сравниваемых группах оценена с применением критерия Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

Пары праймеров к исследованным видам мРНК рецепторов TLRs и RLRs и мРНК MAVS и B2M опубликованы нами ранее [11].

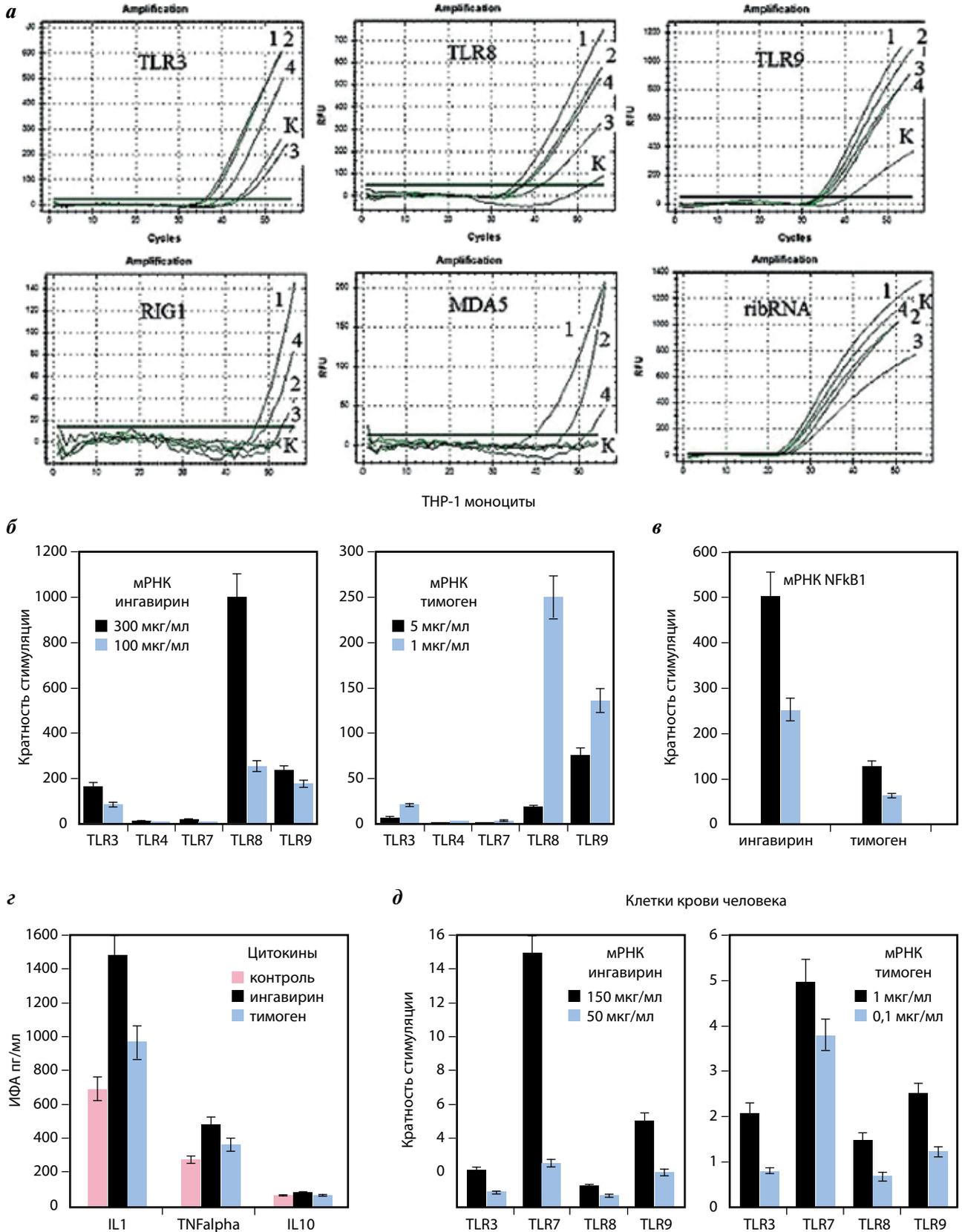
**Уровень цитокинов в культуральной жидкости** определяли с помощью наборов для иммуноферментного анализа (ИФА) (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) согласно прилагаемой инструкции. Измерение оптической плотности и расчет средних концентраций 2 повторных образцов в пг/мл выполнены на микропланшетном фотометре модели Anthos 2010 в программе ADAP+ (Biochrom, Великобритания).

Имунофенотип клеток линии ТНР-1, инкубированных с ингавирином 24 ч при 37 °С, определяли проточной цитометрией с мечеными моноклональными антителами FITC CD14 и PE CD34 (BD Biosciences) на приборе FACSCanto II (Becton Dickinson) в лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДитО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

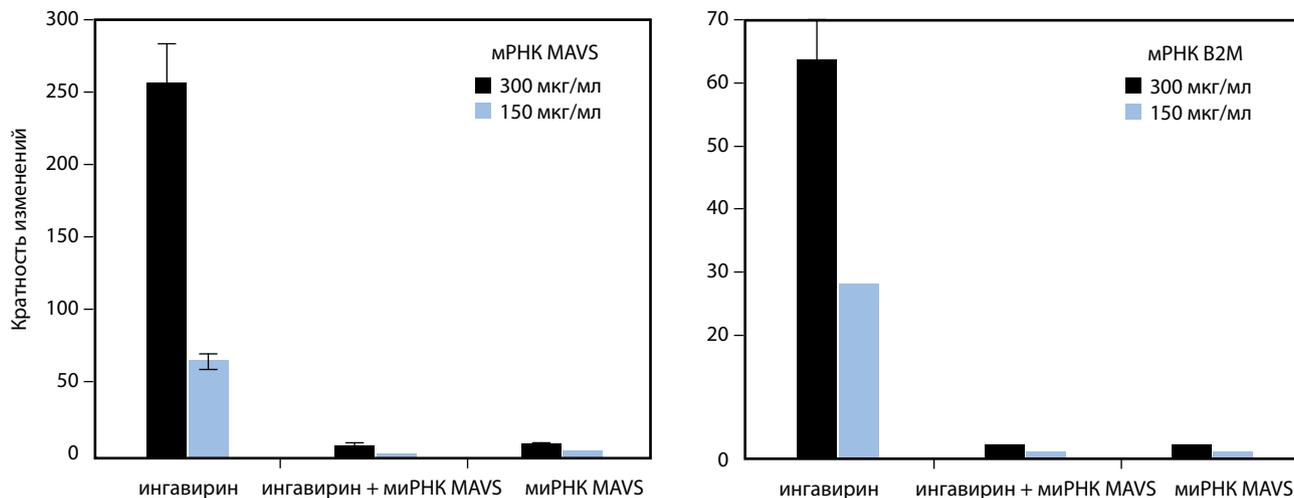
### Результаты и обсуждение

Обнаружение у антивирусных и иммуномодулирующих препаратов свойств агонистов рецепторов TLRs и RLRs объясняет проявляемые ими биологические активности. Наши исследования выполнены на клетках линии моноцитарного лейкоза ТНР-1, чувствительных к агонистам рецепторов врожденного иммунитета [21], с имидазольным (ингавирин) и пептидным (timoген) препаратами. Оба препарата разрешены для клинического применения.

По нашим данным, ингавирин (100 и 300 мкг/мл) и тимоген (1 и 5 мкг/мл) стимулировали экспрессию генов эндосомальных рецепторов TLR 3, 7, 8, 9 в моноцитах ТНР-1 и в клетках крови (рис. 1). Препараты действовали на родственные рецепторы избирательно. В моноцитах ТНР-1 преобладала активация гена TLR8, а в клетках крови – активация гена TLR7. Эти рецепторы имеют близкую химическую структуру и распознают осРНК и имидазольные соединения [24, 25]. Уровни индукции генной активности были



**Рис. 1.** Стимуляция ингавирином и тимогеном экспрессии генов и продукции цитокинов в моноцитах THP-1 (а–в) и клетках крови (д). Кривые накопления специфических ДНК-амплификатов (циклы амплификации *Cq*) (а). Кратность стимуляции активности генов TLRs (б, в) и фактора NFKB1 (в). Секреция цитокинов клетками под действием препаратов (г)



**Рис. 2.** Уровни мРНК MAVS и мРНК B2M в ТНР-1 моноцитах, индуцированных ингавирином и трансфицированных миРНК MAVS. Использовали опубликованную структуру миРНК MAVS [23], которую получили гибридизацией комплементарных нуклеотидов [24]. Трансфекцию миРНК MAVS проводили с помощью реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen) согласно инструкции. Трансфицированные миРНК клетки ( $5 \times 10^5$ /мл) обрабатывали препаратом ингавирин 24 ч при 37 °С

значительно выше в моноцитах ТНР-1 по сравнению с клетками крови доноров. Это подтверждает, что моноциты ТНР-1 являются чувствительной моделью для оценки TLR- и RLR-реакций иммунитета. Индуцирующие эффекты ингавирина были сильнее, чем тимогена, в обоих типах клеток. В клетках линии ТНР-1 конститутивная экспрессия генов хеликаз RIG1 и MDA5 не выявлялась (по данным ПЦР Cq >55). Ингавирин и тимоген стимулировали гены цитоплазматических хеликаз RIG1 и MDA5 и фактора транскрипции NFκB1 в дозовой зависимости (см. рис. 1, в). Увеличивалась секреция клетками воспалительных цитокинов TNF-α и IL1-β (см. рис. 1, з). Методом ИФА не обнаружено индукции ИФН-α и ИФН-γ, хотя на генном уровне ингавирин повышал уровни ИФН-зависимых белков MxA и OAS1 в клетках крови [11]. Возможно, это объясняется более низкой чувствительностью метода ИФА по сравнению с ПЦР или нарушением процессинга этих мРНК в клетках линии моноцитарного лейкоза ТНР-1. Таким образом, препараты ингавирин и тимоген в моноцитах ТНР-1 и клетках крови оказались похожими по профилям индукции генов рецепторов TLR/RLR и воспалительных цитокинов.

Под действием ингавирина в дозе 300 мкг/мл через 24 ч инкубации количество CD34<sup>+</sup> клеток в линии ТНР-1 снижалось на 10 %. Это согласуется с результатами авторов, показавших, что воздействие агонистов на рецепторы TLR7 и TLR8 индуцирует дифференцировку миелоидных предшественников клеток костного мозга CD34<sup>+</sup> [26].

Полученные результаты дают основание считать, что противовирусные и иммуномодулирующие свойства

препаратов ингавирин и тимоген обусловлены активацией сигнальных TLR- и RLR-реакций врожденного иммунитета, несмотря на отличия в химической структуре. Стимуляция конститутивной активности генов сигнальных рецепторов препаратами ингавирин и тимоген была показана нами ранее в клетках ТНР-1 с препаратами ИФН и ИФН-индукторов [22]. Активация реакций врожденного иммунитета важна для активации реакций адаптивного иммунитета в дендритных клетках и макрофагах.

Сигнальные реакции цитоплазматических сенсоров RIG1 и MDA5 осуществляются с участием митохондриального сигнального фактора MAVS [27]. MAVS активирует транскрипционные факторы NFκB1 и IRF3, взаимодействующие с промоторами генов цитокинов [28]. Ингавирин стимулировал экспрессию генов MAVS и B2M в клетках ТНР-1 (рис. 2). Трансфекция миРНК MAVS в активированных клетках ТНР-1 вызывала подавление уровня гомологичной мРНК. Это подтверждает существование механизма РНК-интерференции в клетках миелоидного лейкоза [24].

Такой же ингибиторный эффект наблюдался и в случае гетерологичной мРНК B2M (см. рис. 2). Это указывает на участие сигнального механизма MAVS в активации гена ко-рецептора МНСII адаптивного иммунитета.

Агонисты рецептора TLR7 (имидазолхинолины) ко-локализованы в дендритных клетках с белками комплекса МНСII в эндоплазматической сети [29]. Индукция ко-рецептора B2M МНСII рассматривается как маркер активации дендритных клеток. Препарат имиквимод превращает плазматические

дендритные клетки в эффекторные опухолевые киллеры [20]. Гормон тимозин активирует Т-клеточный ответ дендритных клеток с участием TLR-рецепторов [15]. Поэтому дальнейшее изучение сигнальных реакций антигенпрезентирующих клеток на препараты ингавирин и тимоген необходимо. Сигнальные реакции родственных рецепторов TLR7 и TLR8 имеют особое значение для дифференцировки клеток при остром миелоидном лейкозе [30]. Агонист рецептора TLR8 (резиквимод) активировал сигнальный каскад MyD88/p38 и подавлял рост опухоли у мышей.

### Заключение

Полученные результаты дают основание считать, что противовирусные и иммуномодулирующие свойства препаратов ингавирин и тимоген связаны с активацией одной группы генов сигнальных рецепторов врожденного иммунитета, несмотря на отличия в хи-

мической структуре. Индукция определенных TLR- и RLR-сигнальных путей вызывает дифференцировку предшественников гемопоэтических клеток и активацию реакций адаптивного иммунитета в дендритных клетках и макрофагах. Поэтому наши данные о препаратах ингавирин и тимоген как эффективных стимуляторах генов эндосомальных рецепторов TLR 3, 7, 8, 9 и цитоплазматических сенсоров RIG1 и MDA5 в клетках линии ТНР-1 важны для их дальнейшего эффективного применения. Впервые показано, что ингавирин стимулирует экспрессию генов митохондриального фактора MAVS и гена ко-рецептора МНСII В2М в моноцитах ТНР-1. Это подтверждает взаимосвязь реакций врожденного и адаптивного иммунитета, осуществляемую на транскрипционном уровне. Все вышесказанное дает основания полагать, что отечественные препараты ингавирин и тимоген найдут более широкое клиническое применение при разных формах лейкозов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Pandey S., Singh S., Anang V. et al. Pattern recognition receptors in cancer progression and metastasis. *Cancer Growth Metastasis* 2015;8:25–34. DOI: 0.4137/CGM.S24314. PMID: 26279628.
- Lester S.N., Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J Mol Biol* 2014;426(6):1246–64. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.11.024. PMID: 24316048.
- Cannova J., Breslin S.J.P., Zhang J. Toll-like receptor signaling in hematopoietic homeostasis and the pathogenesis of hematologic diseases. *Front Med* 2015;9(3):288–303. DOI: 10.1007/s11684-015-0412-0. PMID: 26297301.
- Kawai T., Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann NY Acad Sci* 2008;1143:1–20. DOI: 10.1196/annals.1443.020. PMID: 19076341.
- Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Щелканов М.Ю. и др. Эффективность Ингавирина в лечении гриппа у взрослых. *Терапевтический архив* 2009;(3):51–3. [Kolobukhina L.V., Merkulova L.N., Schelkanov M.Yu. et al. Efficacy of Ingavirin in influenza treatment in adults. *Terapevtichesky arkhiv = Therapeutic Archive* 2009;(3):51–3. (In Russ.)].
- Зарубаев В.В., Беляевская С.В., Сироткин А.К. и др. Влияние Ингавирина *in vitro* и *in vivo* на ультраструктуру и инфекционность вируса гриппа. *Вопросы вирусологии* 2011;56(5):21–5. [ZarubaeV.V., Belyaevskaya S.V., Sirotkin A.K. et al. In vitro and in vivo effects of Ingavirin on the ultrastructure and infectivity of influenza virus. *Voprosy virusologii = Problems of Virology* 2011;56(5):21–5. (In Russ.)].
- Небольсин В.Е., Жданов В.В., Жуков Г.Н. и др. Механизмы протективного эффекта Дикарбамина на системе крови при лечении цитостатиками. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2011;3(150):343–7. [Nebolsin V.E., Zhdanov V.V., Zhukov G.N. et al. Mechanisms of protective effect of Dicarbamin on the blood system in cytostatic treatment. *Bulleten experimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2011;3(150):343–7. (In Russ.)]. DOI: 10.1007/s10517-011-1138-x.
- Schön M.P., Schön M. Imiquimod: mode of action. *Br J Dermatol* 2007;157 Suppl 2:8–13. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2007.08265.x. PMID: 18067624.
- Бозрова С.В., Левицкий В.Л., Недоспасов С.А., Друцкая М.С. Имиквимод: биохимические механизмы иммуномодулирующей и противовоспалительной активности. *Биомедицинская химия* 2013;3(59):249–66. [Bozrova S.V., Levitsky V.L., Nedospasov S.A., Drutskaia M.S. Imiquimod: the biochemical mechanisms of immunomodulatory and anti-inflammatory activity. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry* 2013;3(59):249–66. (In Russ.)].
- Patil S.A., Patil S.A., Patil R., Hashizume R. Imidazoquinolines: recent developments in anticancer activity. *Mini Rev Med Chem* 2016;16(4):309–22. PMID: 26675675.
- Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Полосков В.В., Ершов Ф.И. Стимуляция генов сигнальной трансдукции препаратами Ридостин, Циклоферон и Ингавирин. *Цитокины и воспаление* 2015;(2):26–34. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Poloskov V.V., Ershov F.I. Stimulation of signaling transduction gene expression with drugs Ridostin, Cycloferon and Ingavirin. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation* 2015;(2):26–34. (In Russ.)].
- Ашахер Т., Крохин А., Кузнецова И. и др. Влияние препарата Ингавирин (имидазолилэтанамид пентадиовой кислоты) на интерфероновый статус клеток в условиях вирусной инфекции. *Эпидемиология и инфекционные болезни* 2016;21(4):196–205. [Aschacher T., Krokhin A., Kuznetsova I. et al. Effect of the preparation Ingavirin® (imidazolyl ethanamide pentandioic acid) on the interferon status of cells under conditions of viral infection. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases* 2016;21(4):196–205. (In Russ.)]. DOI: 10.18821/1560-9529-2016-21-4-196-205.

13. Семенова Н.П., Прокудина Е.Н., Львов Д.К., Небольсин В.Е. Влияние противовирусного препарата Ингавирин® на внутриклеточные преобразования и импорт в ядро нуклеокапсидного белка вируса гриппа. Вопросы вирусологии 2010;55(5):17–20. [Semenova N.P., Prokudina E.N., Lvov D.K., Nebolsin V.E. Effect of the antiviral drug Ingavirin® on intracellular transformations and import into the nucleus of influenza A virus nucleocapsid protein. *Voprosy virusologii = Problems of Virology* 2010;55(5):17–20. (In Russ.)].
14. Khavinson V.Kh., Lin'kova N.S., Tarnovskaya S.I. Short peptides regulate gene expression. *Bull Exp Biol Med* 2016;162(2):288–92. DOI: 10.1007/s10517-016-3596-7. PMID: 27909961.
15. Romani L., Bistoni F., Montagnoli C. et al. Thymosin alpha1: an endogenous regulator of inflammation, immunity, and tolerance. *Ann NY Acad Sci* 2007;1112:326–38. DOI: 10.1196/annals.1415.002. PMID: 17495242.
16. Garaci E., Pica F., Sinibaldi-Vallebona P. et al. Thymosin alpha(1) in combination with cytokines and chemotherapy for the treatment of cancer. *Int Immunopharmacol* 2003;3(8):1145–50. DOI: 10.1016/S1567-5769(03)00053-5. PMID: 12860169.
17. Lunin S.M., Novoselova E.G. Thymus hormones as prospective anti-inflammatory agents. *Expert Opin Ther Targets* 2010;14(8):775–86. DOI: 10.1517/1472822.2010.499127. PMID: 20536297.
18. Morozov V.G., Khavinson V.K. Natural and synthetic thymic peptides as therapeutics for immune dysfunction. *Int J Immunopharmacol* 1997;19(9–10):501–5. PMID: 9637345.
19. Deigin V., Ksenofontova O., Khrushchev A. et al. Chemical platform for the preparation of synthetic orally active peptidomimetics with hemoregulating activity. *ChemMed Chem* 2016;11(18):1974–7. DOI: 10.1002/cmdc.201600157. PMID: 27457274.
20. Drobits B., Holcman M., Amberg N. et al. Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *J Clin Invest* 2012;122(2):575–85. DOI: 10.1172/JCI161034. PMID: 22251703.
21. Chanput W., Mes J.J., Wichers H.J. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol* 2014;23(1):37–45. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.08.002. PMID: 25130606.
22. Соколова Т.М., Полосков В.В., Бурова О.С. и др. Действие интерферонов и ИФН-индукторов на экспрессию генов TLR/RLR-рецепторов и дифференцировку опухолевых линий клеток ТНР-1 и НСТ-116. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(3):28–33. [Sokolova T.M., Poloskov V.V., Burova O.S. et al. Action interferons and IFN-inductors on TLR/RLRs genes expression and differentiation of tumor cell lines THP-1 and HCN-116. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2016;15(3):28–33. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-28-33.
23. Cheng G., Zhong J., Chung J., Chisari F.V. Double-stranded DNA and double-stranded RNA induce a common antiviral signaling pathway in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(21):9035–40. DOI: 10.1073/pnas.0703285104. PMID: 17517627.
24. Cioca D.P., Aoki Y., Kiyosawa K. RNA interference is a functional pathway with therapeutic potential in human myeloid leukemia cell lines. *Cancer Gene Ther* 2003;10(2):125–33. DOI: 10.1038/sj.cgt.7700544. PMID: 12536201.
25. Diebold S.S., Kaisho T., Hemmi H. et al. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004;303:1529–31. DOI: 10.1126/science.1093616. PMID: 14976261.
26. Sioud M., Floisand Y., Forfang L., Lund-Johansen F. Signaling through toll-like receptor 7/8 induces the differentiation of human bone marrow CD34+ progenitor cells along the myeloid lineage. *J Mol Biol* 2006;364(5):945–54. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.09.054. PMID: 17049554.
27. Loo Y.M., Gale M.Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 2011;34(5):680–92. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.05.003. PMID: 21616437.
28. Seth R.B., Sun L., Ea C.K., Chen Z.J. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 2005;122(5):669–82. DOI: 10.1016/j.cell.2005.08.012. PMID: 16125763.
29. Russo C., Cornella-Taracido I., Galli-Stampino L. et al. Small molecule Toll-like receptor 7 agonists localize to the MHC class II loading compartment of human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2011;117(21):5683–91. DOI: 10.1182/blood-2010-12-328138. PMID: 21487111.
30. Ignatz-Hoover J.J., Wang H., Moreton S.A. et al. The role of TLR8 signaling in acute myeloid leukemia differentiation. *Leukemia* 2015;29(4):918–26. DOI: 10.1038/leu.2014.293. PMID: 25283842.

#### ORCID авторов/ORCID of authors

Т.М. Соколова/T.M. Sokolova: <https://orcid.org/0000-0003-0957-4513>

В.В. Полосков/V.V. Poloskov: <https://orcid.org/0000-0003-0001-2493>

А.Н. Шувалов/A.N. Shuvalov: <https://orcid.org/0000-0003-0972-9001>

О.С. Бурова/O.S. Burova: <https://orcid.org/0000-0001-88-97-01-72>

З.А. Соколова/Z.A. Sokolova: <https://orcid.org/0000-0003-4755-5313>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

# BRCA1 УЧАСТВУЕТ В ЭКСПРЕССИИ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК XIST

Е.А. Шестакова, Т.А. Богущ

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

Контакты: Елена Анатольевна Шестакова elenaanshestakova@mail.ru

**Введение.** Некодирующая РНК гена XIST (*X inactivation-specific transcript*) инициирует процесс инактивации одной из хромосом X в клетках женского организма. Последующие стадии этого процесса включают эпигенетические модификации хроматина, что приводит к ингибированию экспрессии большинства генов на X-хромосоме. В последние годы получены данные, свидетельствующие о том, что белок – супрессор опухолей BRCA1 взаимодействует с неактивной X-хромосомой (*inactive X chromosome, Xi*), влияя на локализацию и транскрипцию РНК XIST.

**Цель исследования** – изучение роли BRCA1 в индукции экспрессии РНК XIST.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служили клеточные линии рака молочной железы (PMЖ), мутантные по гену BRCA1 (*BRCA1<sup>-/-</sup>*): HCC1395, HCC1937, SUM149PT, и в качестве контроля – клеточные линии, содержащие ген BRCA1 дикого типа (*BRCA1<sup>+/+</sup>*): IMR90 и 293T. Для анализа экспрессии РНК XIST использовали полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

**Результаты.** В клоне доксициклин-индуцированной клеточной линии PMЖ HCC1937 наблюдалась экспрессия РНК XIST при индукции BRCA1 (инициации экспрессии гена BRCA1 с последующим синтезом белка BRCA1, который активирует экспрессию РНК XIST, т. е. ее транскрипцию с гена XIST). В клеточных линиях PMЖ HCC1395, HCC1937, SUM149PT, мутантных по гену BRCA1 (*BRCA1<sup>-/-</sup>*) и содержащих нефункциональный белок BRCA1, с помощью ОТ-ПЦР экспрессии РНК XIST не обнаружено. Это говорит о важной роли функционального белка BRCA1 в индукции экспрессии данной РНК.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о роли BRCA1 в экспрессии некодирующей инактивирующей РНК XIST и указывают на участие BRCA1 в ингибировании экспрессии генов на Xi.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, клеточные линии, BRCA1, экспрессия РНК XIST

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-67-74

## BRCA1 PARTICIPATES IN THE EXPRESSION OF NONCODING XIST RNA

E.A. Shestakova, T.A. Bogush

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

**Introduction.** Noncoding RNA of XIST gene (*X inactivation-specific transcript*) initiates inactivation of one of X chromosomes in cells of female organism. Further stages of this process include chromatin epigenetic modifications leading to the inhibition of the most genes on X chromosome. Recently the data were obtained that tumor suppressor BRCA1 is associated with inactive X chromosome (*Xi*) participating in XIST RNA localization on Xi and influencing XIST RNA expression.

**Objective:** to reveal the role of BRCA1 in XIST RNA expression.

**Materials and methods.** The objects of the study were mutant breast cancer cell lines (*BRCA1<sup>-/-</sup>*): HCC1395, HCC1937, SUM149PT, and, as controls – cell lines containing wild type of BRCA1 gene (*BRCA1<sup>+/+</sup>*): IMR90 и 293T. Method of reverse transcription coupled with polymerase chain reaction (RT-PCR) was used for the analysis of XIST RNA expression.

**Results.** In the clone of doxycycline-inducible HCC1937 breast cancer cell line XIST RNA expression was observed upon BRCA1 induction. In HCC1395, HCC1937 and SUM149PT breast cancer cell lines containing mutant BRCA1 gene (*BRCA1<sup>-/-</sup>*) and nonfunctional BRCA1 protein the absence of XIST RNA expression was observed using RT-PCR. This observation indicates the indispensable role of functional BRCA1 protein in XIST RNA expression.

**Conclusion.** Altogether, the data obtained in this study confirm the role of BRCA1 in the expression of noncoding inhibiting XIST RNA and suggest the involvement of BRCA1 in the inhibition of gene expression on Xi.

**Key words:** breast cancer, cell lines, BRCA1, XIST RNA expression

### Введение

Некодирующая РНК гена *XIST* (*X inactivation-specific transcript*) играет ключевую роль в инактивации и стабилизации структуры одной из двух X-хромосом в клетках женского организма, обеспечивая дозовую компенсацию генов, поскольку в клетках мужского организма имеется одна X-хромосома (XY). Распространение РНК *XIST* по X-хромосоме и эпигенетические модификации хроматина приводят к формированию протяженных гетерохроматиновых участков на неактивной X-хромосоме (inactive X chromosome, Xi) и к ингибированию экспрессии более 90 % генов, локализованных на Xi [1, 2]. Инактивация одной из двух X хромосом – один из самых ярких примеров эпигенетической регуляции генной экспрессии на протяжении всей хромосомы, а не отдельных генов или одной области.

Инактивация X-хромосомы начинается с синтеза РНК *XIST* от центра инактивации, включающего ген *XIST* и локализованного на длинном плече X-хромосомы, Xq13 (X-inactivation centre, Xic). Гетерохроматин Xi связан с определенным участком транскрипта РНК *XIST* и с белками комплекса Polycomb, модифицирующими хроматин, что подавляет транскрипцию генов вследствие инактивации их промоторов. В состав гетерохроматина Xi входят также модифицированный гистон масгоH2A, гипоацетилированные гистоны H3 и H4, убиквитинированный H2A, трижды метилированный по остатку лизина 27 гистон H3 (H3K9me3) и метилированные CpG-островки ДНК [2].

В хромосоме Xi различают 2 неперекрывающихся области гетерохроматина [3]. Одна из областей ассоциирована с РНК *XIST*, гистонами масгоH2A и H3K27me3. Вторая область ассоциирована с гетерохроматин-специфичным белком HP1, гистонами H3K9me3 и H3K20me3. При активации транскрипции РНК *XIST* также модифицируются нуклеосомные гистоны. Гистоны в составе гетерохроматина гипоацетилированы по остаткам лизина и легко связываются с кислыми фосфатными группами ДНК, формируя компактную структуру. Метилирование гистона H3 по остаткам лизина 9 и 27 обуславливает высокоаффинную связь H3 с гетерохроматин-специфичным белком HP1.

Белок BRCA1 обладает активностью E3-убиквитинлигазы и отвечает за убиквитинирование топоизомеразы 11α и модификацию ДНК в гетерохроматиновых районах при ее репликации, включая инактивированную Xi. Обнаружена ко-локализация белка BRCA1 с хромоцентрами и перицентромерным гетерохроматином Xi в поздней S-фазе клеточного цикла [4, 5].

С помощью флуоресцентной микроскопии мы показали, что белок BRCA1 вовлечен во взаимодей-

ствии РНК *XIST* с Xi [6,7]. Известно, что активация экспрессии гена *BRCA1* вдвое усиливает транскрипцию *XIST* и ряда других генов [8]. Некодирующая РНК *XIST* является одним из важнейших компонентов эпигенетической регуляции генов на Xi с участием BRCA1, причем экспрессия самого BRCA1 также регулируется на эпигенетическом уровне [9, 10].

В данном исследовании с использованием метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), клеточных линий рака молочной железы (PMЖ), мутантных по гену *BRCA1* (*BRCA1*<sup>-/-</sup>), и контрольных клеточных линий, содержащих ген *BRCA1* дикого типа (*BRCA1*<sup>+/+</sup>), показано, что BRCA1 может регулировать экспрессию РНК *XIST*, что указывает на участие BRCA1 в ингибировании экспрессии генов на Xi. Так как BRCA1 может регулировать экспрессию РНК *XIST*, которая участвует в инактивации X-хромосомы и ингибировании около 90 % генов, расположенных на X-хромосоме, следовательно, BRCA1, влияя на экспрессию РНК *XIST*, оказывает влияние через РНК *XIST* также и на экспрессию генов на Xi, вызывая ингибирование транскрипции этих генов.

**Цель исследования** – изучение роли BRCA1 в индукции экспрессии РНК *XIST* на клеточных линиях PMЖ.

### Материалы и методы

**Культуры клеток.** В работе использовали следующие клеточные линии PMЖ, мутантные по гену *BRCA1* (*BRCA1*<sup>-/-</sup>): HCC1937, HCC1395, SUM149PT.

Клеточная линия HCC1937 содержит одну из самых распространенных в российской популяции мутацию (founder mutation) в гене *BRCA1*: 5382insC [11–16]. Клеточная линия HCC1395 содержит мутацию 5251C>T в гене *BRCA1* [16]. Обе клеточные линии – HCC1937 и HCC1395 – относятся к трижды негативному PMЖ (ТНPMЖ), поэтому в клетках не экспрессируются эстрогеновый рецептор (estrogen receptor negative, ER<sup>-</sup>), прогестероновый рецептор (progesterone receptor negative, PR<sup>-</sup>) и рецептор эпидермального фактора роста человека (human epidermal growth factor receptor 2/neu negative, HER2/neu<sup>-</sup>), или ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>-</sup>, и синтезируется мутантный белок BRCA1 [11, 17]. Эти 2 линии относятся к базально-подобному типу PMЖ [17, 18]. Клетки линий HCC1937 и HCC1395 культивировали в среде RPMI-1640, содержащей антибиотики, L-глутамин и 10 % эмбриональную телячью сыворотку.

Клетки линии SUM149PT содержат мутацию 2288delT в гене *BRCA1* и синтезируют мутантный белок BRCA1 [11]. В клетках линии SUM149PT не экспрессируются эстрогеновый и прогестероновый рецепторы, но экспрессируется рецептор эпидермального фактора роста человека HER2/neu

(ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>+</sup>). Клетки SUM149PT культивировали в среде Ham's F-12, содержащей гидрокортизон (1 мкг/мл), инсулин (5 мкг/мл) и 10 % эмбриональную телячью сыворотку.

Диплоидные иммортализованные фибробласты линии IMR90 и эпителиальные клетки эмбриональной почки линии 293T получены от лиц женского пола (XX). Обе линии культивировали в среде DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), содержащей антибиотики, L-глутамин, незаменимые аминокислоты и 10 % эмбриональную телячью сыворотку.

**Индукция доксициклином клона клеток линии HCC1937, стабильно трансфецированных доксициклин-индуцируемым аллелем BRCA1.** Клетки линии HCC1937, стабильно трансфецированные доксициклин-индуцируемым аллелем BRCA1 (клон 5), обрабатывали доксициклином (doxycycline, Dox) в концентрации 2 мкг/мл в течение 24 ч.

**Флуоресцентная гибридизация *in situ*, сопряженная с иммунофлуоресцентным окрашиванием клеток (иммуноFISH).** Синтез белка BRCA1 и экспрессию РНК *XIST* анализировали с использованием модифицированного метода флуоресцентной гибридизации *in situ*, сопряженной с иммунофлуоресцентным окрашиванием клеток (иммуноFISH), как описано в работе [19].

Клетки, выросшие на покровных стеклах, помещенных в культуральные чашки, фиксировали 20 мин в 1 % параформальдегиде в фосфатном буфере (PBS), затем 10 мин в метаноле при  $-20^{\circ}\text{C}$ , далее 5 мин пермеабилizировали в растворе 0,1 % Тритона X-100 в PBS и инкубировали с первичными мышинными моноклональными антителами к BRCA1 (sc6954, Santa Cruz Biotechnology, 1:4000) и вторичными козьими флуоресцентно-меченными антителами против иммуноглобулинов G мыши (FITC goat anti-mouse IgG, Molecular Probes) по 45 мин при комнатной температуре. После иммунофлуоресцентного окрашивания клетки еще раз фиксировали в 4 % параформальдегиде в PBS и пермеабилizировали в растворе 0,1 % Тритона X-100 в PBS по 3 мин, обрабатывали раствором 0,1 М Tris-HCl pH 7,0 в течение 2 мин и дважды – 2xSSC по 2 мин. Далее клетки дегидратировали в 70, 80, 90 и 100 % этаноле по 2 мин при  $4^{\circ}\text{C}$  и высушивали на воздухе. Затем клетки обрабатывали РНКазой А (100 мкг/мл) в течение 45 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ , промывали, дегидратировали и высушивали на воздухе. С помощью стандартного протокола ник-трансляции (nick translation) 10 нг плазмидного зонда, содержащего вставку РНК *XIST*, метили Spectrum Red (Amersham-Pharmacia). Пробу, помещенную в раствор для гибридизации, содержащий 75 % формамид, 10 % декстран сульфат, 2xSSC, 2,5 мг (50 мкл) одноцепочечной ДНК из спермы лосося (Boehringer), денатурировали 5 мин при  $95^{\circ}\text{C}$ . Каплю этого рас-

творя с денатурированной пробой наносили на чистое предметное стекло и закрывали покровным стеклом с клетками, мечеными флуоресцентными антителами. Для денатурации ДНК в клетках стекла прогревали 5 мин при  $80^{\circ}\text{C}$ , а затем инкубировали с пробой в течение ночи при  $37^{\circ}\text{C}$ . Далее покровные стекла с клетками по 30 мин промывали в 2xSSC при  $37^{\circ}\text{C}$ , в 1xSSC и в 0,5xSSC – при комнатной температуре. Для флуоресцентной микроскопии клетки на покровном стекле заключали в каплю среды Мовиол (Mounting media), нанесенную на чистое предметное стекло.

**Проведение ОТ-ПЦР.** РНК выделяли из культуры клеток с использованием набора реагентов RNA-Mini kit (Qiagen) по инструкции производителя. Для синтеза кДНК на матрице геномной РНК использовали набор реагентов Superscript One-Step RT-PCR (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Последующую ПЦР проводили с парой праймеров – прямым и обратным, комплементарными концу экзона 5 (5'-GTGCAGAGAGCTGAGTCTTCAGC) и началу экзона 6 (5'-GCAAAGGCACACGAAAGA-AATAGC) гена *XIST* соответственно.

Реакционная смесь в общем объеме 50 мкл содержала 5 мкл 10-кратного буфера для полимеразы Taq (Taq polymerase), 3 мкл 25 мМ раствора  $\text{MgCl}_2$  (конечная концентрация в реакционной смеси 1,5 мМ), 0,4 мкл смеси 4 дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), каждый в концентрации 25 мМ (конечная концентрация каждого из нуклеотидов в реакционной смеси 200 мкМ), 1 мкл раствора кДНК, 2 мкл прямого и 2 мкл обратного праймера, 0,5 мкл полимеразы Taq (Sigma) и 36,1 мкл  $\text{H}_2\text{O}$ .

ПЦР проводили в следующих условиях: 1 цикл при  $94^{\circ}\text{C}$  в течение 1 мин, 25 циклов при  $94^{\circ}\text{C}$  в течение 30 с, далее при  $68^{\circ}\text{C}$  в течение 30 с и затем при  $72^{\circ}\text{C}$  в течение 1 мин 30 с; 1 цикл при  $72^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин; охлаждали при  $4^{\circ}\text{C}$ .

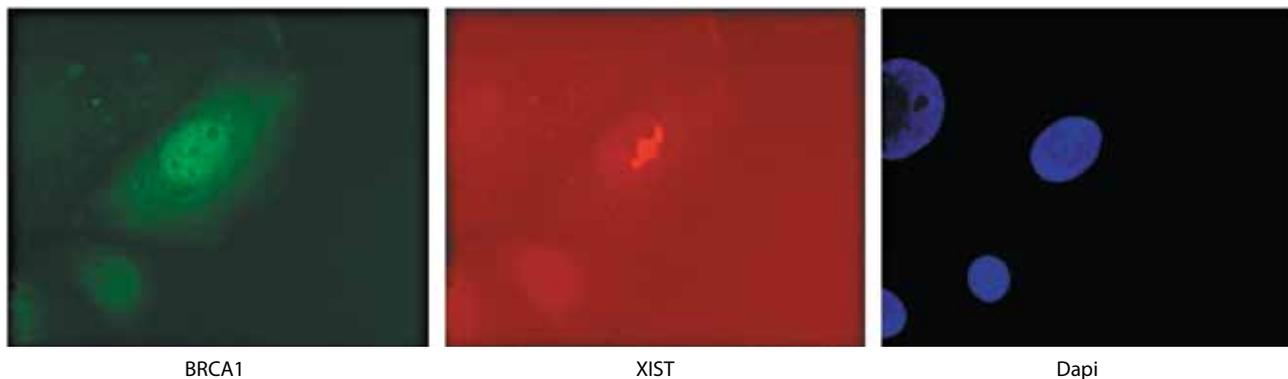
Продукты ПЦР разделяли в 2 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

#### Результаты и обсуждение

**Индукция Dox клона клеток HCC1937, стабильно трансфецированных Dox-индуцируемым аллелем BRCA1, приводит к экспрессии РНК *XIST*.**

Мы неоднократно обнаруживали ранее, что BRCA1 участвует в ассоциации некодирующей РНК *XIST* с Xi. Кроме того, полученные нами результаты подтверждают роль BRCA1 в регуляции экспрессии РНК *XIST*.

Мы показали, что при экспрессии BRCA1, индуцированной Dox, в ядрах у части клеток выявляется большое количество РНК *XIST*, что указывает на участие BRCA1 в активации транскрипции РНК *XIST* (рис. 1). В частности, среди 293 Dox-индуцированных



BRCA1

XIST

Dapi

**Рис. 1.** Индукция *Dox* клон клеток *HCC1937*, стабильно трансфицированных *Dox*-индуцируемым аллелем *BRCA1*, приводит к экспрессии РНК *XIST*. Клетки обрабатывали *Dox* в концентрации 2 мкг/мл в течение 24 ч и анализировали методом иммуноFISH. Микрофотографии получены с помощью флуоресцентной микроскопии. *BRCA1* – FITC, РНК *XIST* – Spectrum Red

клеток наблюдалось 9 трансфицированных клеток, которые экспрессировали *BRCA1*. При этом в 8 (89 %) из этих *BRCA1*-экспрессирующих клеток наблюдалось накопление РНК *XIST* в ядрах (см. рис. 1). В 319 контрольных клетках, которые не инкубировали с *Dox*, экспрессии *BRCA1* и накопления РНК *XIST* не наблюдалось.

Полученные данные согласуются с результатами G.J. Pageau и соавт. [20], показавших, что в клетках линии *HCC1937*, стабильно синтезирующих белок *BRCA1*, выявляется транскрипция локуса *XIST* – одного из генов, экспрессия которого усиливается в результате индукции экспрессии *BRCA1* [8].

В данных экспериментах при *Dox*-индуцированной экспрессии *BRCA1* в ядрах доли клеток выявляется область, содержащая большое количество РНК *XIST*, не всегда совпадающая с локусом гена *XIST* на *Xi*. В связи с этими данными следует упомянуть работу S.M. Sitchia и соавт. [21], в которой на клеточной линии РМЖ *MCF7* показано, что большие количества РНК *XIST* в ядрах клеток РМЖ не обязательно связаны с наличием *Xi* и не всегда перекрываются с областями *X*-хромосомы.

Клетки ТНРМЖ линий *HCC1937* и *HCC1395*, содержащие мутантный белок *BRCA1*, не экспрессируют РНК *XIST*.

Анализ экспрессии РНК *XIST* методом ОТ-ПЦР в различных клеточных линиях показал, что клеточные линии, не синтезирующие белок *BRCA1* (*BRCA1*<sup>-/-</sup>), не экспрессируют РНК *XIST*, в то время как контрольные клеточные линии, синтезирующие белок *BRCA1* (*BRCA1*<sup>+/+</sup>), экспрессируют значительные количества РНК *XIST* (рис. 2, 3).

Для анализа экспрессии РНК *XIST* методом ОТ-ПЦР использовали клеточную линию *HCC1937* с преобладающей среди пациентов с наследственным РМЖ мутацией в экзоне 20 гена *BRCA1*: 5382insC [11–16], а также клетки линии *HCC1395* с мутацией 5251C>T в гене *BRCA1* [16]. Обе эти линии относятся

к ТНРМЖ и не экспрессируют рецепторы эстрогенов (ER<sup>-</sup>), прогестерона (PR<sup>-</sup>) и эпидермального фактора роста человека (HER2/neu<sup>-</sup>), т.е. являются ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>-</sup>. Однако в клетках этих линий синтезируется мутантный белок *BRCA1* [11, 17]. Обе линии относятся к базальноподобному типу РМЖ [17, 18].

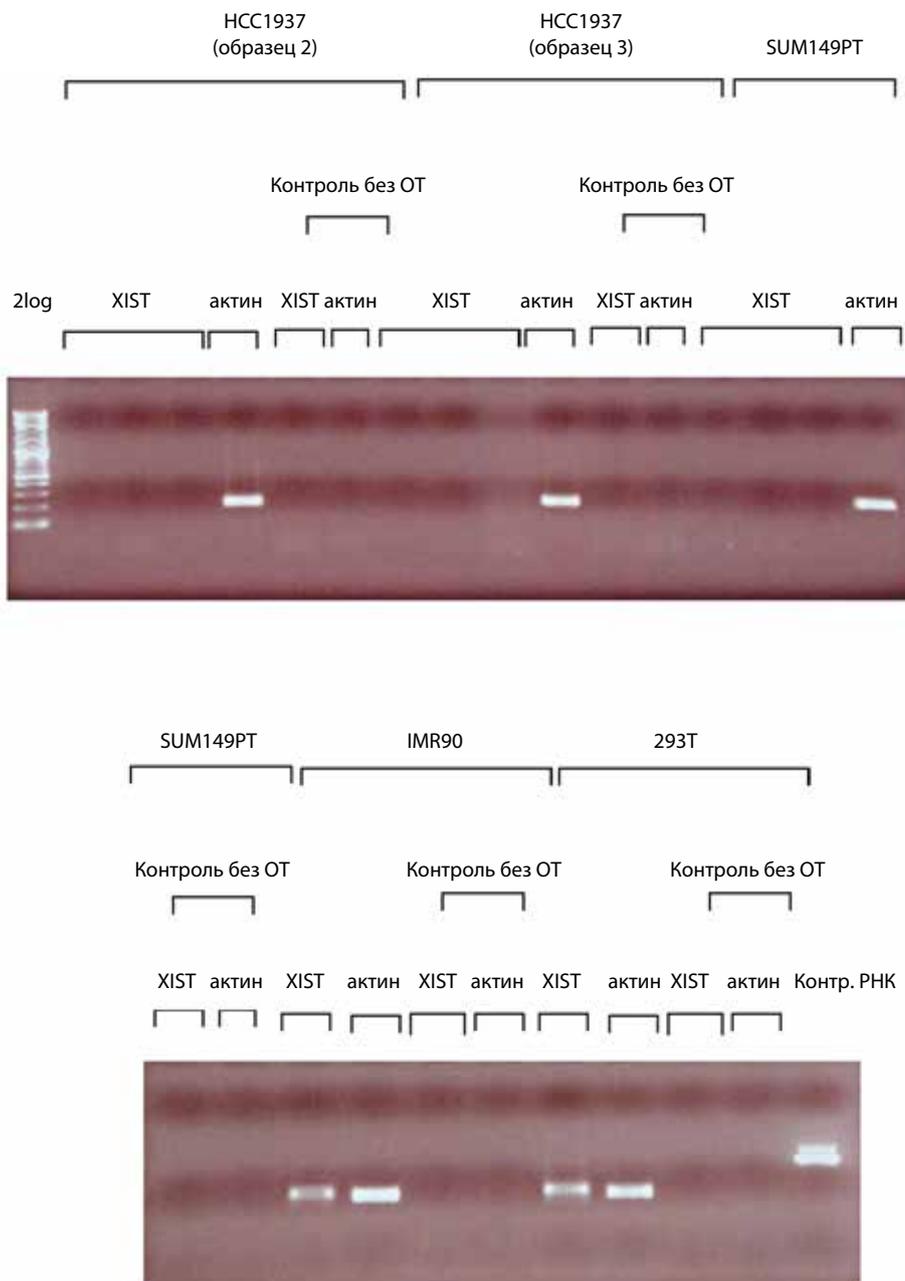
Как показано на рис. 2, РНК *XIST* не выявлена ни в одной из двух указанных линий ТНРМЖ, содержащих нефункциональный мутантный белок *BRCA1*. Для сравнения, экспрессия актина в клетках линий *HCC1937* и *HCC1395* соответствовала норме (см. рис. 2). Отсутствие РНК *XIST* в клетках *BRCA1*<sup>-/-</sup> может быть также связано и с потерей этими клетками *Xi*, которая наблюдается в некоторых клетках *BRCA1*<sup>-/-</sup> [22].

В качестве контроля использовали диплоидные иммортализованные фибробласты человека линии *IMR90* и эпителиальные клетки эмбриональной почки человека линии *293T*, в которых экспрессируется ген *BRCA1* дикого типа и, следовательно, функциональный белок *BRCA1*. Как показано на рис. 2, в этих клетках наблюдается экспрессия РНК *XIST*, а также референсной РНК актина.

Так как в методе ОТ-ПЦР используется стадия обратной транскрипции, в которой с РНК синтезируется комплементарная ДНК (кДНК) с помощью фермента ОТ, были проведены контрольные реакции с отсутствием стадии ОТ, для того чтобы удостовериться, что в препарате выделенной геномной РНК нет примесей геномной ДНК. С примесью геномной ДНК может синтезироваться продукт реакции ПЦР с помощью полимеразы Taq, узнающей субстрат ДНК. Оказалось, что при проведении ПЦР без предшествующей стадии ОТ не наблюдалось продукта реакции ПЦР, что говорит об отсутствии примесей геномной ДНК в препарате выделенной геномной РНК (см. рис. 2).

В наших экспериментах РНК *XIST* не была идентифицирована в клетках *HCC1937* клон 5, стабильно трансфицированных *Dox*-индуцируемым аллелем





**Рис. 3.** Анализ уровня экспрессии РНК *XIST* в клетках РМЖ линии *SUM149PT* с использованием ОТ-ПЦР. На рисунке представлен гель с продуктами ОТ-ПЦР, окрашенный бромидом этидия

*BRCA1* и мутантным белком *BRCA1* [11] (см. рис. 3). В отличие от клеток ТНРМЖ линий *HCC1937* и *HCC1395*, в клетках линии *SUM149PT* не экспрессируются эстрогеновый и прогестероновый рецепторы, но экспрессируется рецептор эпидермального фактора роста человека ( $ER^-/PR^-/HER2/neu^+$ ).

Оказалось, что в клетках РМЖ линии *SUM149PT*, как и в клетках ТНРМЖ линий *HCC1937* и *HCC1395*, содержащих нефункциональный мутантный белок *BRCA1*, экспрессии РНК *XIST* не наблюдалось (см. рис. 3).

### Заключение

В клетках некоторых линий РМЖ, содержащих мутантный ген *BRCA1* и соответствующий нефункциональный белок *BRCA1*, экспрессия РНК *XIST* отсутствует. Это указывает на возможный вклад *BRCA1* в регуляцию экспрессии РНК *XIST*.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о роли *BRCA1* в экспрессии некодирующей ингибирующей РНК *XIST* и позволяют предположить участие *BRCA1* в ингибировании экспрессии генов на  $X_i$ , обусловленном влиянием *BRCA1* на ас-

социацию РНК *XIST* с *Xi*. Полученные данные согласуются с работой [23], выполненной с использованием анализа герминальных мутаций в больших популяциях больных спорадическим и наследственным РМЖ и/или раком яичников. В случае мутантного *BRCA1* нарушаются экспрессия и ассоциация РНК *XIST* с транскрипционно неактивной X-хро-

мосомой, а также эпигенетическая трансрегуляция генной экспрессии. Помимо этого, нарушаются убиквитинирование топоизомеразы *11α* и структура гетерохроматиновых районов генома, включая инактивированную X-хромосому, что может привести к накоплению ошибок репликации и репарации ДНК и в итоге к развитию патологий, включая РМЖ.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Galupa R., Heard E. X-chromosome inactivation: new insights into cis and trans regulation. *Curr Opin Genet Dev* 2015;31:57–66. DOI: 10.1016/j.gde.2015.04.002. PMID: 26004255.
- Heard E. Recent advances in X-chromosome inactivation. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16(3):247–55. DOI: 10.1016/j.ceb.2004.03.005. PMID: 15145348.
- Chadwick B.P., Willard H.F. Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(50):17450–5. DOI: 10.1073/pnas.0408021101. PMID: 15574503.
- Chadwick B.P., Lane T.F. *BRCA1* associates with the inactive X chromosome in late S-phase, coupled with transient H2AX phosphorylation. *Chromosoma* 2005;114(6):432–9. DOI: 10.1007/s00412-005-0029-1. PMID: 16240122.
- Pageau G.J., Lawrence J.B. *BRCA1* foci in normal S-phase nuclei are linked to interphase centromeres and replication of pericentric heterochromatin. *J Cell Biol* 2006;175(5):693–701. DOI: 10.1083/jcb.200602055. PMID: 17145961.
- Ganesan S.C., Silver D.P., Greenberg R.A. et al. *BRCA1* supports *XIST* RNA concentration on the inactive X chromosome. *Cell* 2002;111(3):393–405. PMID: 12419249.
- Silver D.P., Dimitrov S.D., Feunteun J. et al. Further evidence for *BRCA1* communication with the inactive X chromosome. *Cell* 2007;128(5):991–1002. DOI: 10.1016/j.cell.2007.02.025. PMID: 17350581.
- Welsh P.L., Lee M.K., Gonzalez-Hernandez R.M. et al. *BRCA1* transcriptionally regulates genes involved in breast tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(11):7560–5. DOI: 10.1073/pnas.062181799. PMID: 12032322.
- Shestakova E.A. Epigenetic regulation of *BRCA1* expression and its role in breast cancer stem cell development. *Turk J Biol* 2016;40(5):981–9. DOI: 10.3906/biy-1507-145.
- Богуш Т.А., Шестакова Е.А., Вихлянцева Н.О. и др. Эпигенетические механизмы регуляции *BRCA1*. *Онкогинекология* 2017;23(2):4–11. [Bogush T.A., Shestakova E.A., Vikhlyantseva N.O. et al. Epigenetic mechanisms of regulation of *BRCA1*. *Онкогинекология* 2017;23(2):4–11. (In Russ.)].
- Elstrodt F., Hollestelle A., Nagel J.H. et al. *BRCA1* mutation analysis of 41 human breast cancer cell lines reveals three new deleterious mutants. *Cancer Res* 2006;66(1):41–5. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2853. PMID: 16397213.
- Karami F., Mehdi-pour P. A comprehensive focus on global spectrum of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in breast cancer. *Biomed Res Int* 2013;2013:928562. DOI: 10.1155/2013/928562. PMID: 24312913.
- Wang F., Fang Q., Ge Z. et al. Common *BRCA1* and *BRCA2* mutations in breast cancer families: a meta-analysis from systematic review. *Mol Biol Rep* 2012;39(3):2109–18. DOI: 10.1007/s11033-011-0958-0. PMID: 21643751.
- Iyevleva A.G., Suspitsin E.N., Kroeze K. et al. Non-founder *BRCA1* mutations in Russian breast cancer patients. *Cancer Lett* 2010;298(2):258–63. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.07.013. PMID: 20727672.
- Stadler Z.K., Salo-Mullen E., Patil S.M. et al. Prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Ashkenazi Jewish families with breast and pancreatic cancer. *Cancer* 2012;118(2):493–9. DOI: 10.1002/cncr.26191. PMID: 21598239.
- Stephens P.J., McBride D.J., Lin M.L. et al. Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature* 2009;462(7276):1005–10. DOI: 10.1038/nature08645. PMID: 20033038.
- Olsson E., Winter C., George A. et al. Mutation screening of 1,237 cancer genes across Six model cell lines of basal-like breast cancer. *PLoS One* 2015;10(12):e0144528. DOI: 10.1371/journal.pone.0144528. PMID: 26670335.
- Lehmann B.D., Bauer J.A., Chen X. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011;121(7):2750–67. DOI: 10.1172/JCI45014. PMID: 21633166.
- Robert-Forcel I., Junera H.R., Geraud G. et al. Three-dimensional organization of the ribosomal genes and Ag-NOR proteins during interphase and mitosis in PtK1 cells studied by confocal microscopy. *Chromosoma* 1993;102(3):146–57. PMID: 7681367.
- Pageau G.J., Hall L.L., Lawrence J.B. *BRCA1* does not paint the inactive X to localize *XIST* RNA but may contribute to broad changes in cancer that impact *XIST* and *Xi* heterochromatin. *J Cell Biochem* 2007;100(4):835–50. DOI: 10.1002/jcb.21188. PMID: 17146760.
- Sirchia S.M., Tabano S., Monti L. et al. Misbehaviour of *XIST* RNA in breast cancer cells. *PLoS One* 2009;4(5):e5559. DOI: 10.1371/journal.pone.0005559. PMID: 19440381.
- Richardson A.L., Wang Z.C., De Nicolo A. et al. X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer Cell* 2006;9(2):121–32. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.01.013. PMID: 16473279.
- Поспехова Н.И. Комплексный анализ наследственной формы рака молочной железы и/или яичников: молекулярно-генетические и фенотипические характеристики. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2011. [Pospekhova N.I. Complex analysis of hereditary form of breast and/or ovarian cancer: molecular genetic and phenotypic characteristics. Author's abstract of thesis ... of doctor of medical sciences. Moscow, 2011. (In Russ.)].

**Благодарности**

Выражаю благодарность профессору Дэвиду М. Ливингстону (Prof. D.M. Livingston) за финансирование и общее руководство данным исследованием, выполненным в Онкологическом институте Дана–Фарбер (Бостон, США). Представленное исследование поддержано грантами Национального института онкологических исследований (США) (National Cancer Institute, USA), Фонда по исследованиям в области рака молочной железы (США) (Breast Cancer Research Foundation, USA), Института по биомедицинским исследованиям Novartis (США) (Novartis Institute for Biomedical Research, USA), выданными профессору Дэвиду М. Ливингстону (Prof. D.M. Livingston).

**ORCID авторов/ORCID of authors**

Е.А. Шестакова/E.A. Shestakova: <https://orcid.org/0000-0002-0158-4605>

Т.А. Богдаш/Т.А. Bogdash: <https://orcid.org/0000-0002-7673-4284>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

# НЕЙРОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА АНТРАФУРАНА

В.А. Голибродо, И.Д. Трещалин, А.Е. Щекотихин, Э.Р. Переверзева

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

**Контакты:** Василиса Антоновна Голибродо vasilisa2006@gmail.com

**Введение.** В настоящее время исследование нейротоксических свойств новых лекарственных средств является обязательным этапом на пути продвижения препарата в клиническую практику. В ФГБНУ «НИИНА» разработан оригинальный противоопухолевый препарат антрафуран (ЛХТА-2034), который проявил высокую противоопухолевую активность в отношении перевиваемых опухолей мышей. Предыдущие исследования показали, что препарат в высоких дозах вызывает повреждение тканей головного мозга.

**Цель исследования** — пилотное изучение нейротоксических свойств антрафурана.

**Материалы и методы.** В эксперименте были использованы 52 беспородные крысы-самки. Суспензию препарата в воде для инъекций вводили перорально однократно в максимально переносимой дозе 170 мг/кг. Тестирование проводили в установке «открытое поле» через 1, 4, 8 ч и повторно через сутки и месяц после введения.

**Результаты.** Установлено, что после введения антрафурана у крыс снижается как двигательная (пройденное расстояние, средняя скорость), так и исследовательская (число вертикальных стоек, заглядываний в отверстия в полу — «норки») активность по сравнению с контролем. Эти эффекты проявляются в наибольшей степени через 4 ч после введения препарата. Через сутки при повторном тестировании этой группы исследуемые показатели увеличивались, тогда как у животных контрольной группы при повторном посещении знакомой обстановки «открытого поля» они снижались.

**Заключение.** Антрафуран оказывает обратимое ингибирующее действие на двигательную и исследовательскую активность крыс.

**Ключевые слова:** антрафуран, ЛХТА-2034, доклинические исследования, нейротоксичность, «открытое поле»

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-75-79

## NEUROTOXIC PROPERTIES OF NEW ANTITUMOR AGENT ANTHRAFURAN

V.A. Golibrodov, I.D. Treshchalin, A.E. Shchekotikhin, E.R. Pereverzeva

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

**Introduction.** Currently, the study of the neurotoxic properties of new drugs is an indispensable step towards the promotion of the medicine to clinical practice. The original antitumor drug anthrafuran (LCTA-2034), obtained in Gause Institute of New Antibiotics, has demonstrated high activity against transplantable mice tumors. Previous studies have shown that the drug in high doses causes brain tissues damage.

**Objective:** a pilot investigation of anthrafuran neurotoxicity.

**Materials and methods.** The study was carried out on 52 female outbred rats. The suspension of drug in water for injection was administered per os at a single maximum tolerated dose of 170 mg/kg. The testing was performed on "open field" setting 1, 4 and 8 h and repeated on day 1 and 30 post treatment.

**Results.** It was found that the administration of the drug reduced both motor (covered distance, average speed) and research (the number of rearings, contacts with the "burrow") activity as compared to control. These effects were manifested to the greatest extent 4 h post treatment. A day later, when rats re-visit "open field", the parameters under study increased in this group, while in the control group these indicators decreased.

**Conclusion.** Anthrafuran exhibits a reversible inhibitory effect on the motor and research activity of rats.

**Key words:** anthrafuran, LCTA-2034, preclinical studies, neurotoxicity, "open field"

### Введение

Известно, что нейротоксичность является одним из специфических системных осложнений противоопухолевой химиотерапии [1, 2]. При ее проведении

у больных злокачественными новообразованиями обнаруживаются расстройства памяти, снижение когнитивных функций, повышенная утомляемость, периферическая нейропатия, нарушение координации

и другие эффекты [3–6], которые могут сохраняться на протяжении длительного времени после прекращения введения препаратов. Нейротоксичность оказывает значительное влияние на качество жизни пациентов, а в ряде случаев приводит к необходимости отклонения от оптимальной стратегии лечения [5].

Проявления нейротоксичности, как правило, дозозависимы и специфичны для разных классов противоопухолевых препаратов. Так, препараты платины (цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин) наиболее часто вызывают периферическую нейропатию [3]. Таксаны (паклитаксел, доцетаксел) помимо синдрома периферической нейропатии могут индуцировать энцефалопатию в виде преходящей спутанности сознания, афазии, нарушений поведения, атаксии. Частота нейротоксических эффектов антиметаболитов (фторурацил) мала. В основном это острая мозжечковая дисфункция или диффузное поражение головного мозга [2]. Хотя прямых корреляций между специфической патологией мозга и ее физиологическим проявлением в большинстве случаев не установлено, многие из этих видов нейротоксичности могут быть выявлены еще на этапе доклинических исследований с помощью разработанной системы поведенческих тестов [7–9].

Одним из этапов токсикологических исследований новых лекарственных средств является оценка их влияния на нервную систему. Первоначальное доклиническое тестирование потенциальных нейротоксических свойств препаратов основано на изучении поведенческих реакций, которые могут быть отражением коммуникации и интеграции нервных клеток, их морфологического повреждения [9]. Поведение может отражать действие как на центральную, так и на периферическую нервную систему. При изучении поведенческих реакций в фармакологии широко применяется метод «открытого поля», позволяющий изучить двигательную активность, изменение поведения, координации, чувствительно-двигательных рефлексов, влияние на память и обучаемость [9–11].

Разработанный в ФГБНУ «НИИНА» оригинальный противоопухолевый препарат антрафуран (ЛХТА-2034) является потенциальным противоопухолевым агентом, относящимся к новому классу противоопухолевых гетероциклических производных антрахинона [12]. Антрафуран обладает высокой эффективностью на различных моделях сингенных опухолей мышей [13, 14]. Ранее было выявлено, что препарат в высоких дозах вызывает повреждения тканей мозга, предположительно преодолевая гематоэнцефалический барьер [15]. Этот факт обусловил необходимость проведения исследования влияния антрафурана на нервную систему.

**Целью исследования** ставилась предварительная оценка нейротоксичности препарата в тесте «открытое поле» после однократного перорального введения в максимально переносимой дозе.

#### Материалы и методы

Исследование было выполнено в соответствии с требованиями Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств [16], согласно действующим в Российской Федерации Правилам лабораторной практики [17], а также согласно Национальному стандарту Российской Федерации (ГОСТ Р 53434–2009). Работа соответствует этическим нормам обращения с животными, принятым Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [18].

В работе использованы беспородные крысы-самки массой тела 220–280 г, полученные из Научного центра биомедицинских технологий РАН, филиал «Андреевка». После 2-недельного карантина животные были разделены на 4 группы по 13 голов в каждой. Для исследования была выбрана доза 170 мг/кг – экспериментально установленная максимально переносимая доза для крыс при пероральном применении. Прототип лекарственной формы препарата для твердых желатиновых капсул [19] непосредственно перед экспериментом растворяли в воде для инъекций и в 2 % концентрации однократно вводили в желудок при помощи шприца со специальным металлическим зондом. Контрольным животным вводили воду для инъекций. На протяжении эксперимента следили за состоянием животных и поведением в домашних клетках.

Крыс тестировали в установке «открытое поле» (ООО «НПК Открытая Наука») при помощи программы EthoVision 8.5 (Noldus Information Technology). Тестирование поведения осуществлялось в сроки 1 ч (группа 1), 4 ч (группа 2) и 8 ч (группа 3) после введения антрафурана. Контрольных животных (группа 4) тестировали через 1 ч после перорального введения воды для инъекций. Через 24 ч и 30 сут после введения проводили повторный эксперимент в «открытом поле». Длительность тестирования составляла 5 мин. За 1 ч до начала опыта крыс приносили в экспериментальную комнату для привыкания к обстановке. В автоматическом режиме регистрировали следующие параметры: пройденное расстояние (см), среднюю скорость (см/с), двигательную активность в центральной и периферической зонах. В полуавтоматическом режиме фиксировали число эпизодов грумिंगа, вертикальных стоек, заглядываний в отверстия в полу – «норки».

Для определения достоверности межгрупповых различий данные проанализированы t-тестом Стьюдента.

Показатели двигательной и исследовательской активности крыс в тесте «открытое поле» в разные сроки после введения антрафурана ( $M \pm m$ )

| Группа                                 | Пройденное расстояние, см | Средняя скорость, см/с | Число стоек | Число заглядываний в «норки» | Число эпизодов груминга |
|--|---------------------------|------------------------|-------------|------------------------------|-------------------------|
| <b>Первое тестирование</b>             |                           |                        |             |                              |                         |
| 1 (1 ч)                                | 2054,7 ± 268,7*           | 6,9 ± 0,9*             | 7,9 ± 1,6   | 4,3 ± 0,7                    | 2,1 ± 0,5               |
| 2 (4 ч)                                | 1702,8 ± 183*             | 5,7 ± 0,6*             | 4,1 ± 0,7*  | 2,9 ± 0,5*                   | 1,3 ± 0,2*              |
| 3 (8 ч)                                | 1987,2 ± 216*             | 7,1 ± 0,7*             | 7,2 ± 1,1   | 3,2 ± 0,7*                   | 3,0 ± 0,5               |
| 4 (контроль)                           | 2682,5 ± 146              | 9,4 ± 0,5              | 9,7 ± 1,4   | 5,8 ± 0,9                    | 2,5 ± 0,6               |
| <b>Повторное тестирование (24 ч)</b>   |                           |                        |             |                              |                         |
| 1 (1 ч)                                | 1487,9 ± 174,8*           | 4,9 ± 0,6*             | 4,3 ± 0,6** | 2,6 ± 0,5**                  | 1,8 ± 0,3               |
| 2 (4 ч)                                | 1992,7 ± 181,1*           | 6,7 ± 0,6*             | 7,4 ± 1,3** | 3,8 ± 0,6                    | 3,3 ± 0,5**             |
| 3 (8 ч)                                | 1843,1 ± 135,8*           | 6,2 ± 0,5*             | 2,8 ± 0,7** | 1,5 ± 0,2**                  | 1,9 ± 0,3**             |
| 4 (контроль)                           | 2582,9 ± 106,5            | 9,4 ± 0,5              | 5,7 ± 1,2** | 2,8 ± 0,7**                  | 2,4 ± 0,5               |
| <b>Повторное тестирование (30 сут)</b> |                           |                        |             |                              |                         |
| 1 (1 ч)                                | 1493,5 ± 141,5            | 5,2 ± 0,4              | 4,1 ± 0,9   | 1,9 ± 0,3                    | 2,4 ± 0,4               |
| 2 (4 ч)                                | 1726,6 ± 225,7            | 5,8 ± 0,8              | 3,5 ± 0,8   | 2,5 ± 0,7                    | 2,4 ± 0,5               |
| 3 (8 ч)                                | 1766,3 ± 173,8            | 7,5 ± 1,3              | 4,6 ± 0,8   | 3,1 ± 0,9                    | 3,4 ± 0,7               |
| 4 (контроль)                           | 1560,6 ± 210,1            | 5,2 ± 0,7              | 6,0 ± 1,1   | 2,4 ± 0,5                    | 3,8 ± 0,7               |

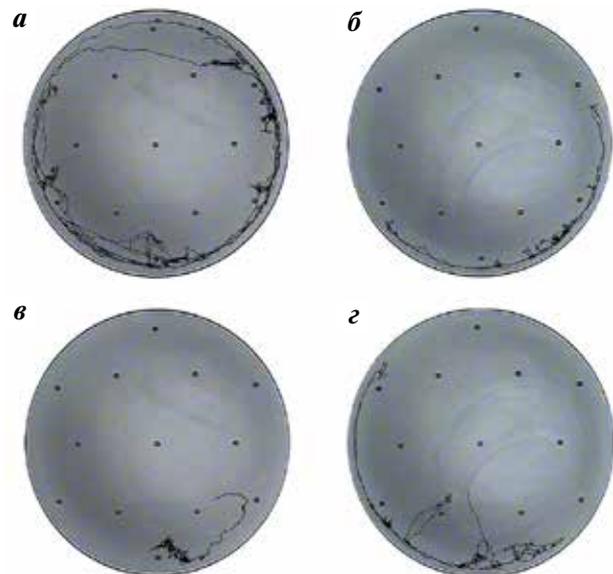
**Примечание.** \* – достоверно отличается от контроля при  $p \leq 0,05$ ; \*\* – достоверно отличается от первого тестирования той же группы при  $p \leq 0,05$ .

Статистический анализ проведен при помощи программы Microsoft Excel 2010. Различия определялись как достоверные при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Изучение поведенческих реакций крыс, получавших антрафуран, в тесте «открытое поле» показало, что препарат оказывает влияние на двигательную и исследовательскую активность животных. Визуальное наблюдение за поведением крыс после введения антрафурана, находящихся в домашних клетках, не выявило отклонений, однако показатели двигательной активности в тесте «открытое поле» (пройденное расстояние и средняя скорость животных) значительно и достоверно снижались по сравнению с контролем (см. таблицу). Этот эффект проявлялся уже через 1 ч, а максимальное угнетение двигательной активности происходило через 4 ч после применения препарата (группа 2). При этом показатели, зарегистрированные на этом сроке наблюдения, статистически значимо отличались от данных, полученных для групп 1 и 3. Если животные контрольной группы активно исследовали арену, то через 4 ч после применения антрафурана крысы практически оставались на одном месте (см. рисунок).

При повторном тестировании через 24 ч параметры двигательной активности животных групп 1, 3



Типичные треки крыс в тесте «открытое поле»: а – контроль; б – группа 1 (1 ч после введения антрафурана); в – группа 2 (4 ч после введения антрафурана); г – группа 3 (8 ч после введения антрафурана)

и 4 (контрольной) снижались, что объясняется посещением уже знакомой обстановки «открытого поля», в то время как показатели двигательной активности животных группы 2 повышались по сравнению с первым тестированием.

Уменьшение пройденного расстояния в использованном нами тесте является одним из характерных проявлений нейротоксичности противоопухолевых препаратов. Так, двигательная активность крыс снижается после введения цисплатина, паклитаксела, винкристина [20–22]. В то же время внутривенное введение доксорубина не оказывает влияния на пройденное расстояние и среднюю скорость животных в «открытом поле» [23].

Исследовательская активность крыс (по числу вертикальных стоек и заглядываний в отверстия в полу – «норки») достоверно снижалась на сроках 4 и 8 ч после введения антрафурана. Уменьшение числа вертикальных стоек в «открытом поле» было отмечено и после введения крысам цисплатина [24].

При повторном тестировании через сутки исследовательская активность снижалась у животных групп 1, 3 и 4 (см. таблицу). В то же время у крыс группы 2 число стоек и заглядываний в «норки» достоверно увеличивалось, т. е. животные вели себя как в незнакомой обстановке, исследуя ее после мало-подвижного первого пребывания.

Через 30 сут после первого тестирования показатели двигательной и исследовательской активности крыс всех экспериментальных групп в «открытом поле» достоверно не отличались от контроля, что говорит об обратимости обнаруженных эффектов.

Таким образом, однократное пероральное введение антрафурана в максимально переносимой дозе приводит к снижению активности крыс в «открытом поле». Угнетающее воздействие препарата на пове-

денческие реакции животных сохраняется и спустя сутки после его применения. Через 30 сут признаков нейротоксического действия антрафурана не выявлено.

Выявленные эффекты могут быть связаны с действием антрафурана как на центральную, так и на периферическую нервную систему. Кроме того, гиподинамия может объясняться и влиянием препарата на мышечную ткань. Снижение показателей исследовательской активности может определяться как угнетением двигательной активности, так и изменениями памяти и когнитивных функций мозга. Для того чтобы установить причины отклонений в поведении, необходимо расширить панель поведенческих методик, а также определить, носят ли они функциональный характер или связаны с повреждением структур центральной и периферической нервной системы. Таким образом, обнаруженные изменения поведенческих реакций крыс после применения антрафурана требуют дополнительных исследований.

#### Заключение

Проведенный эксперимент показал, что антрафуран оказывает угнетающее влияние на локомоторную активность животных в «открытом поле». Оно наиболее выражено через 4 ч после применения препарата. Через 30 сут после первого тестирования показатели двигательной и исследовательской активности крыс, получавших препарат, не отличаются от контроля, что свидетельствует об обратимости его нейротоксического действия.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Корман Д.Б. Основы противоопухолевой химиотерапии. М.: Практическая медицина, 2006. 512 с. [Korman D.B. Basics of anticancer chemotherapy. Moscow: Practical medicine, 2006. 512 p. (In Russ.)].
2. Семенова А.И. Кардио- и нейротоксичность противоопухолевых препаратов (патогенез, клиника, профилактика, лечение). Практическая онкология 2009;10(3):168–76. [Semenova A.I. Cardio- and neurotoxicity of antitumor drugs (pathogenesis, clinic, prophylaxis, treatment). *Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology* 2009;10(3):168–76. (In Russ.)].
3. Amptoulach S., Tsavaris N. Neurotoxicity caused by the treatment with platinum analogues. *Chemother Res Pract* 2011;2011:843019. DOI: 10.1155/2011/843019. PMID: 22312559.
4. Baudino B., D'agata F., Caroppo P. et al. The chemotherapy long-term effect on cognitive functions and brain metabolism in lymphoma patients. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2012;56(6):559–68. PMID: 23172518.
5. Vichaya E.G., Chiu G.S., Krukowski K. et al. Mechanisms of chemotherapy-induced behavioral toxicities. *Front Neurosci* 2015;9:131. DOI: 10.3389/fnins.2015.00131. PMID: 25954147.
6. Yang M., Moon C. Neurotoxicity of cancer chemotherapy. *Neural Regen Res* 2013;8(17):1606–14. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.17.009. PMID: 25206457.
7. Boehmerle W., Huehnen P., Peruzzaro S. et al. Electrophysiological, behavioral and histological characterization of paclitaxel, cisplatin, vincristine and bortezomib-induced neuropathy in C57Bl/6 mice. *Sci Rep* 2014;4:6370. DOI: 10.1038/srep06370. PMID: 25231679.
8. Höke A., Ray M. Rodent models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *ILAR J* 2014;54(3):273–81. DOI: 10.1093/ilar/ilt053. PMID: 24615440.
9. Moser V.C. Functional Assays for Neurotoxicity Testing. *Toxicol Pathol* 2011;39(1):36–45. DOI: 10.1177/0192623310385255. PMID: 21075917.
10. Абрашова Т.В., Гушин Я.А., Ковалева М.А. и др. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. Справочник. СПб.: ЛЕМА, 2013. 116 с. [Abrashova T.V., Gushchin Ya.A., Kovaleva M.A. et al. Physiological, biochemical and biometric indicators of experimental animals. Handbook. St. Petersburg: LEMA, 2013. 116 p. (In Russ.)].

11. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Высшая школа, 1991. 399 с. [Buresh Ya., Bureshova O., Houston D.P. Techniques and basic experiments in studying of brain and behavior. Moscow: Higher School, 1991. 399 p. (In Russ.)].
12. Tikhomirov A.S., Shtil A.A., Shchekotikhin A. E. Advances in the discovery of anthraquinone-based anticancer agents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2018;13(2):159–83. DOI: 10.2174/1574892813666171206123114. PMID: 29210664.
13. Treshalina H.M., Romanenko V.I., Kaluzhny D.N. et al. Development and pharmaceutical evaluation of the anticancer Anthrafuran/Cavitron complex, a prototypic parenteral drug formulation. *Eur J Pharm Sci* 2017;109:631–7. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.09.025. PMID: 28927751.
14. Shchekotikhin A. E., Dezhenkova L.G., Tsvetkov V.B. et al. Discovery of antitumor anthra[2,3-*b*]furan-3-carboxamides: optimization of synthesis and evaluation of antitumor properties. *Eur J Med Chem* 2016;112:114–29. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.01.050. PMID: 26890118.
15. Трещалин М.И., Трещалин И.Д., Голибродо В.А. и др. Экспериментальная оценка токсических свойств ЛХТА-2034 при пероральном применении. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(3):81–8. [Treshchalin M.I., Treshchalin I.D., Golibrodov V.A. et al. Experimental evaluation of toxic properties of LCTA-2034 by the oral route of administration. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(3):81–8. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-81-88.
16. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. Часть 1. М.: Гриф и Ко, 2012. С. 13–24. [Guideline for preclinical studies of drugs. Ed. A.N. Mironov. Part I. Moscow: Grif & K, 2012. Pp. 13–24. (In Russ.)].
17. Правила надлежащей лабораторной практики. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н. [The rules of good laboratory practice. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation, April 1, 2016, No. 199n. (In Russ.)].
18. Council of Europe. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. ETS 1986:123.
19. Щекотихин А.Е., Трещалина Е.М., Трещалин И.Д. Пероральные противоопухолевые средства и способ лечения онкологических заболеваний. Патент РФ № 2639479 от 21.12.2017. [Shchekotikhin A. E., Treshchalina E. M., Treshchalin I. D. Oral antitumor drugs and method for oncological diseases treatment. Patent RF No. 2639479, 21.12.2017. (In Russ.)].
20. Alimoradi H., Pourmohammadi N., Mehr S.E. et al. Effects of lithium on peripheral neuropathy induced by vincristine in rats. *Acta Med Iran* 2012;50(6):373–9. PMID: 22837115.
21. Barzegar-Fallah A., Alimoradi H., Mehrzadi S. et al. The neuroprotective effect of tropisetron on vincristine-induced neurotoxicity. *Neurotoxicology* 2014;41:1–8. DOI: 10.1016/j.neuro.2013.12.002. PMID: 24374478.
22. Pourmohammadi N., Alimoradi H., Mehr S.E. et al. Lithium attenuates peripheral neuropathy induced by paclitaxel in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012;110(3):231–7. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2011.00795.x. PMID: 21917116.
23. Liedke P.E., Reolon G.K., Kilpp B. et al. Systemic administration of doxorubicin impairs aversively motivated memory in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;94(2):239–43. DOI: 10.1016/j.pbb.2009.09.001. PMID: 19747935.
24. Jangra A., Kwatra M., Singh T. et al. Edaravone alleviates cisplatin-induced neurobehavioral deficits via modulation of oxidative stress and inflammatory mediators in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 2016;791:51–61. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.08.003. PMID: 27492363.

#### ORCID авторов/ORCID of authors

В.А. Голибродо/V.A. Golibrodov: <https://orcid.org/0000-0001-8643-6427>

И.Д. Трещалин/I.D. Treshchalin: <https://orcid.org/0000-0001-7331-5490>

А.Е. Щекотихин/A.E. Shchekotikhin: <https://orcid.org/0000-0002-6595-0811>

Э.Р. Переверзева/E.R. Pereverzeva: <https://orcid.org/0000-0001-7368-9695>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

# ЭКВИТОКСИЧНОСТЬ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ГИДРОКСИКАРБАМИДА И ПРЕПАРАТА СРАВНЕНИЯ ГИДРЕА НА КРЫСАХ

О.И. Коняева<sup>1</sup>, Н.Ю. Кульбачевская<sup>1</sup>, В.А. Чалей<sup>1</sup>, Н.П. Ермакова<sup>1</sup>,  
И.Б. Меркулова<sup>1</sup>, Т.В. Абрамова<sup>1</sup>, И.С. Касаткина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;  
<sup>2</sup>ООО «Экспертно-юридический центр»; Россия, 109052 Москва, ул. Нижегородская, 29–33, стр. 27, офис 316

**Контакты:** Ольга Ивановна Коняева [natkulba@mail.ru](mailto:natkulba@mail.ru)

**Введение.** Появление качественных и эффективных дженериков позволяет существенно снизить расходы на лекарственное обеспечение населения России. По экспертным оценкам, стоимость курса лечения онкологических больных дженериками отечественного производства может быть на 30–40 % ниже по сравнению с оригинальными препаратами. В России на производстве ООО «Озон» создан отечественный аналог оригинального противоопухолевого препарата гидреа – гидроксикарбамид.

**Цель исследования** – сравнительное изучение хронической токсичности препарата гидроксикарбамид (ООО «Озон», Россия) и зарегистрированного препарата сравнения гидреа (Corden Pharma Latina S. p. A., Италия) на крысах.

**Материалы и методы.** Сравнительное исследование токсичности препаратов проводили на 70 неинбредных белых крысах-самцах массой 220–250 г, полученных из аккредитованного питомника лабораторных животных ООО «Кролинфо». Оба препарата параллельно вводили ежедневно перорально 5-кратно в 3 дозы. В качестве растворителя использовали 1 % крахмальный клейстер. Дозы рассчитывали по данным литературы исходя из максимально переносимой дозы. Использовали стандартные методы оценки хронической токсичности препаратов на крысах.

**Результаты.** Полученные данные по хронической токсичности сравниваемых форм отечественного препарата гидроксикарбамид и зарегистрированного препарата сравнения гидреа существенно не отличаются по показателям количественной и качественной токсичности (летальность, биомаркеры токсичности, морфометрия органов).

**Выводы.** Сравнимые воспроизведенный и коммерческий препараты практически эквитоксичны при 5-кратном пероральном введении крысам.

**Ключевые слова:** гидроксикарбамид, гидреа, эквитоксичность, крысы

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-80-86

## EQUITOXICITY OF DOMESTIC HYDROXYCARBAMIDE AND REFERENCE DRUG HYDREA IN RATS

O.I. Konyaeva<sup>1</sup>, N.Yu. Kulbachevskaya<sup>1</sup>, V.A. Chaley<sup>1</sup>, N.P. Ermakova<sup>1</sup>, I.B. Merkulova<sup>1</sup>, T.V. Abramova<sup>1</sup>, I.S. Kasatkina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation;  
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

<sup>2</sup>Expert-Law Center; Office 316, Build. 27, 29–33 Nizhegorodskaya St., Moscow 109052, Russia

**Introduction.** The appearance of high-quality and effective generics can significantly reduce the cost of health care for the drug supply of the population of Russia. According to expert estimates, the cost of treatment of cancer patients with generics of domestic can be 30–40 % cheaper as compared to the original drugs. In Russia the pharmaceutical production company “Ozon” created by the domestic analogue of the original anticancer drug hydrea – hydroxycarbamide.

**Objective:** comparative study of chronic toxicity of the drug hydroxycarbamide (“Ozon”, Russia) and registered reference drug hydrea (Corden Pharma Latina S. p. A., Italy) on rats.

**Materials and methods.** A comparative study of the toxicity of drugs was carried out on 70 non-inbred white male rats weighing 220–250 g obtained from the accredited laboratory animal nursery of LLC “Krolinfo”. Both drugs were administered in parallel daily orally 5-fold in 3 doses. As a solvent, 1 % starch paste was used. Doses were calculated according to the literature data on the basis of maximum tolerated dose. Standard methods of evaluation of chronic toxicity of drugs in rats were used.

**Results.** The obtained data on chronic toxicity of the compared forms of the domestic drug hydroxycarbamide and the reference drug hydrea do not differ significantly in terms of quantitative and qualitative toxicity (lethality, biomarkers of toxicity, morphometry of organs).

**Conclusion.** The compared generic and commercial preparations are practically equitoxic by 5 times oral administration to rats.

**Key words:** hydroxycarbamide, hydrea, equitoxicity, rats

### Введение

Появление качественных и эффективных дженериков позволяет существенно снизить расходы органов здравоохранения и повысить доступность лекарственного обеспечения населения России. В России на производстве ООО «Озон» создан отечественный аналог оригинального противоопухолевого препарата гидреа (ГД) – гидроксикарбамид (ГК). ГК имеет такие же показания к применению и суточную дозировку, как и оригинальный лекарственный препарат.

В экспериментах на мышах и крысах при разных путях введения (внутрижелудочный и внутрибрюшинный) изучены параметры острой токсичности субстанции ГК. Клиническая картина острого отравления ГК у крыс и у мышей проявлялась в общей заторможенности и гиподинамии. Высокие токсические (летальные) дозы вызывали у животных атаксию, адинамию, в отдельных случаях клонико-тонические судороги, паралич. При воздействии доз 2250–5760 мг/кг у крыс и 6350–7330 мг/кг у мышей наблюдались заторможенность, адинамия, паралич. Мыши погибали на 4–5-е сутки, большинство крыс – на 3–4-е сутки после введения фармацевтической субстанции. Печень и селезенка у погибших животных были темные, полнокровные. Внешние признаки интоксикации у большинства животных исчезали на 11–12-е сутки после введения препарата. Макроскопический патологоанатомический осмотр животных, умерщвленных по окончании 14 сут наблюдения, не выявил каких-либо существенных различий в сравнении с контрольными животными [1, 2].

При установлении  $LD_{50}$  при внутрибрюшинном введении насыщенный раствор ГК вводили белым крысам и мышам в максимально возможном объеме (дозы составили: для крыс – от 4700 до 5700 мг/кг, для мышей – от 5800 до 6800 мг/кг) [2].  $LD_{50}$  при внутрижелудочном введении для белых крыс и мышей составили соответственно  $2719,36 \pm 300,34$  и  $6506,9 \pm 569,7$  мг/кг; при внутрибрюшинном – более 5700 и более 6800 мг/кг [3].

**Цель исследования** – сравнительное изучение хронической токсичности препарата ГК (ООО «Озон», Россия) и зарегистрированного препарата сравнения ГД (Corden Pharma Latina S. p. A., Италия) на крысах.

### Материалы и методы

Сравнительное исследование токсичности ГК и ГД проводили на 70 неинбредных белых крысах-самцах массой 220–250 г, полученных из аккредитованного питомника лабораторных животных ООО «Кролинфо». Все животные были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Эксперимент проводился в период с октября по декабрь 2017 г. Исследование выполне-

но в соответствии с национальными требованиями с учетом методических рекомендаций [4–9].

Исследуемые препараты:

- 1) ГК – отечественный препарат, производитель ООО «Озон» (Россия), капсулы по 500 мг, серии 010317;
- 2) ГД – препарат сравнения, производитель Corden Pharma Latina S. p. A. (Италия), капсулы по 500 мг, серии 6G03510.

В опытах по изучению хронической токсичности оба препарата (содержимое капсул) параллельно вводили ежедневно перорально 5-кратно в 3 дозах. В качестве растворителя использовали 1 % крахмальный клейстер. Дозы рассчитаны по данным литературы исходя из максимально переносимой дозы (МПД):

- суммарная доза 3000 мг/кг ( $\approx 2$  МПД), разовая доза 600 мг/кг;
- суммарная доза 1500 мг/кг ( $\approx 1$  МПД), разовая доза 300 мг/кг;
- суммарная доза 750 мг/кг ( $\approx 1/2$  МПД), разовая доза 150 мг/кг.

Контрольным животным вводили ежедневно перорально 5-кратно 1 % крахмальный клейстер в объеме, соответствующем объему максимальной дозы.

В каждой группе животных использовали по 10 крыс, включая контроль, 5 крыс из каждой группы выводили из эксперимента на 3-и сутки, остальные 5 – на 30-е сутки после окончания курса введения препаратов.

Критериями оценки хронической токсичности являлись: число павших животных и сроки их гибели, динамика массы тела (исследования проводили на 3, 7, 14, 21 и 30-е сутки), клиническая картина интоксикации, данные клинико-лабораторных исследований, поведенческие реакции и патологические изменения в тканях и внутренних органах, выявляемые при аутопсии павших и выживших животных, выведенных из эксперимента в конце опыта (макроскопическая оценка). Продолжительность наблюдения за животными составляла 30 сут. Сравнивали действие препаратов на уровни клеток, циркулирующих в периферической крови, функциональное состояние печени, почек, желудочно-кишечного тракта.

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

### Результаты

Сравнительная токсичность ГК и ГД при ежедневном 5-кратном пероральном введении крысам-самцам

представлена в табл. 1. Установлено, что препараты имеют практически одинаковые внешние проявления токсичности при введении в максимальной суммарной дозе 3000 мг/кг – вялость и пилоэрекция. ГК и ГД независимо от дозы не вызывали гибели животных, не изменяли их поведенческие реакции. Анализ изменения массы тела крыс после 5-кратного перорального введения ГК и ГД свидетельствует о практически одинаковом влиянии препаратов на динамику этого показателя. Масса тела крыс, получавших ГК и ГД, по сравнению с контрольными животными дозозависимо уменьшалась на 3–7-е сутки после окончания введения препаратов с последующим восстановлением к 21–30-м суткам наблюдения (рис. 1).

Динамика изменений уровней циркулирующих в периферической крови клеток в группах крыс, получавших ГК и ГД, была практически одинакова: дозозависимое уменьшение количества эритроцитов (с соответствующим снижением уровня гемоглобина и гематокрита) и дозозависимое уменьшение количества тромбоцитов. Изменение показателей периферической крови крыс отмечалось на 3–7-е сутки после ежедневного 5-кратного перорального введения ГК и ГД с последующим восстановлением к 21–30-м суткам наблюдения по сравнению с данными контрольных животных, получавших 1 % крахмальный клейстер (рис. 2, 3).

ГК и ГД после 5-кратного перорального ежедневного введения либо не изменяли уровни биомаркеров в сыворотке крови крыс по сравнению с данными

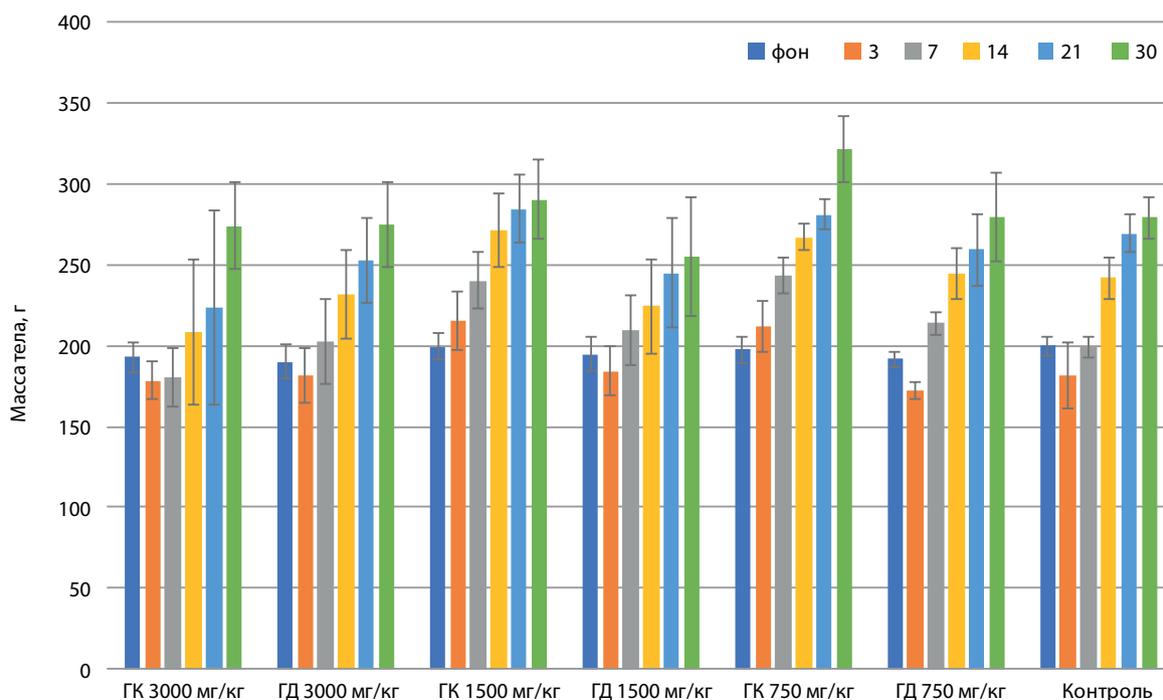
**Таблица 1.** Сравнительная токсичность ГК и ГД при ежедневном 5-кратном пероральном введении крысам-самцам

| Препарат | Разовая доза, мг/кг | Суммарная доза, мг/кг | Гибель от токсичности, пало/всего |
|----------|---------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| Контроль | 0                   | 0                     | 0/10                              |
| ГК       | 600                 | 3000                  | 0/10                              |
|          | 300                 | 1500                  | 0/10                              |
|          | 150                 | 750                   | 0/10                              |
| ГД       | 600                 | 3000                  | 0/10                              |
|          | 300                 | 1500                  | 0/10                              |
|          | 150                 | 750                   | 0/10                              |

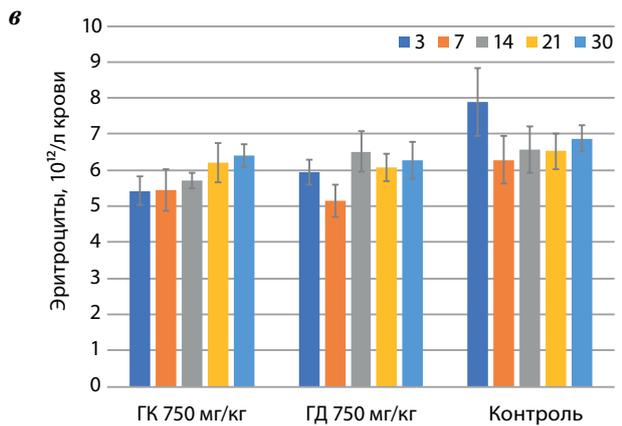
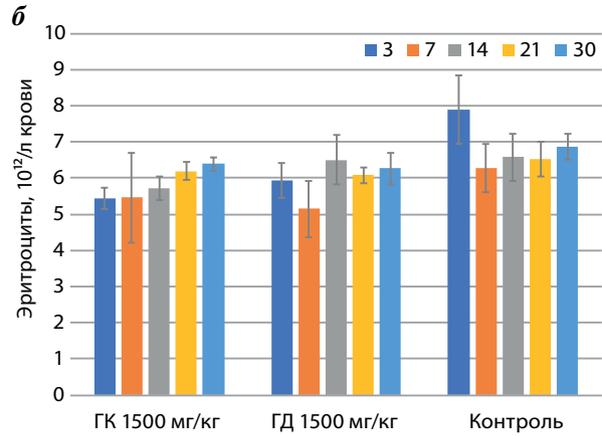
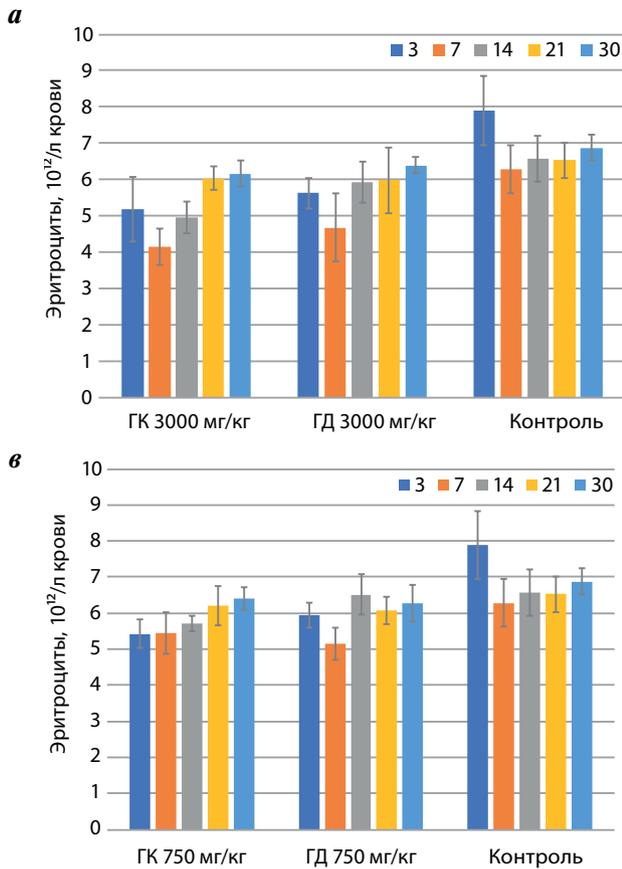
контрольных животных, либо вызывали однотипные изменения. Учитывая видовые особенности животных, можно сделать вывод о практически идентичном проявлении токсического действия исследуемых препаратов (рис. 4).

Установлено, что ГК и препарат сравнения ГД не отличаются по влиянию на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы крыс (табл. 2).

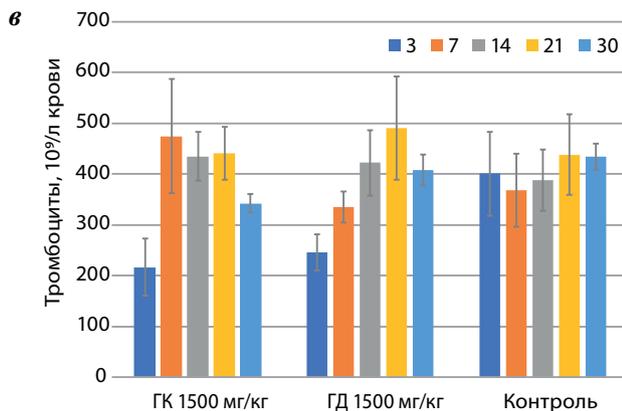
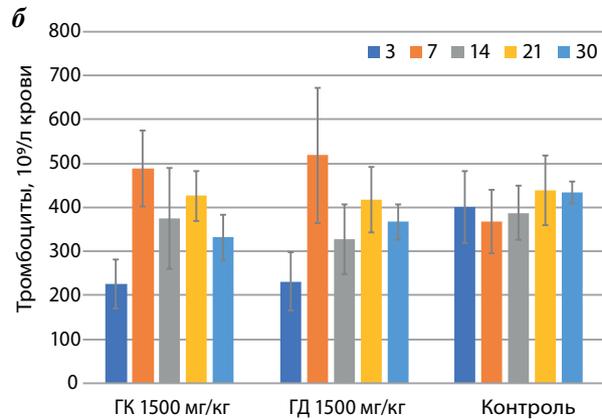
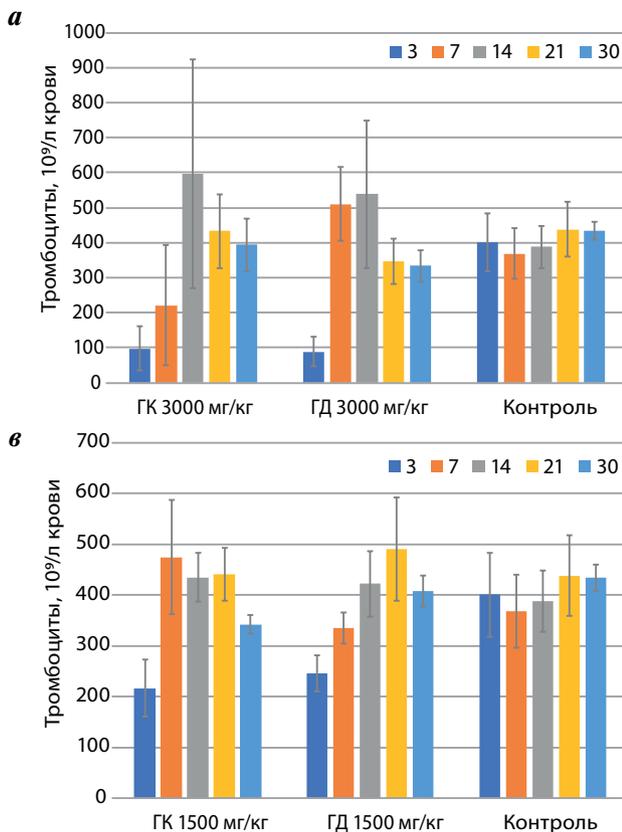
При морфометрическом анализе относительной массы печени, селезенки, почек, сердца и тимуса крыс было установлено, что ГК и ГД во всех исследованных дозах практически не оказывали влияния на изменения массы данных органов либо вызывали однотипные изменения как на 3-и, так и на 30-е сутки наблюдения по сравнению с изменениями



**Рис. 1.** Динамика массы тела неинбредных крыс-самцов после 5-кратного перорального ежедневного введения ГК и ГД в равных дозах



**Рис. 2.** Сравнение динамики уровня эритроцитов в крови неинбредных крыс-самцов после 5-кратного перорального ежедневного введения ГК и ГД в равных дозах: а – суммарная доза 3000 мг/кг; б – 1500 мг/кг; в – 750 мг/кг



**Рис. 3.** Сравнение динамики уровня тромбоцитов в крови неинбредных крыс-самцов 5-кратного перорального ежедневного введения ГК и ГД в равных дозах: а – суммарная доза 3000 мг/кг; б – 1500 мг/кг; в – 750 мг/кг

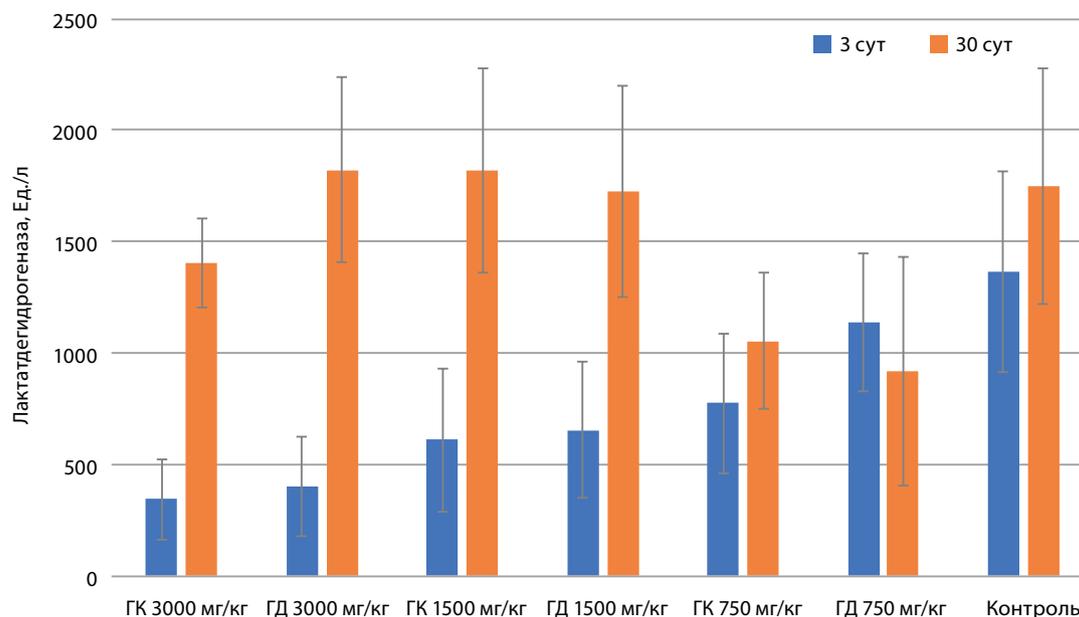


Рис. 4. Уровень лактатдегидрогеназы в сыворотке крови крыс после 5-кратного перорального ежедневного введения ГК и ГД

Таблица 2. Показатели электрокардиограммы неинбредных крыс-самцов после ежедневного (в течение 5 дней) перорального введения ГК и ГД в суммарной дозе 3000 мг/кг

| Группа                                       | Сутки опыта   |               |               |
|--|---------------|---------------|---------------|
|  | 3-и           | 15-е          | 30-е          |
| <b>Частота сердечных сокращений (уд/мин)</b> |               |               |               |
| ГК   | 428,2 ± 21,5  | 424,6 ± 8,8   | 398,5 ± 20,7  |
| ГД   | 364,2 ± 21,4  | 414,4 ± 19,1  | 354,8 ± 16,6  |
| Контроль                                     | 445,0 ± 32,2  | 396,8 ± 11,0  | 338,2 ± 22,4  |
| <b>RR (с)</b>                                |               |               |               |
| ГК   | 0,142 ± 0,007 | 0,142 ± 0,003 | 0,152 ± 0,009 |
| ГД   | 0,167 ± 0,011 | 0,146 ± 0,007 | 0,170 ± 0,007 |
| Контроль                                     | 0,138 ± 0,011 | 0,152 ± 0,004 | 0,181 ± 0,012 |
| <b>PQ (с)</b>                                |               |               |               |
| ГК   | 0,060 ± 0,000 | 0,056 ± 0,002 | 0,063 ± 0,006 |
| ГД   | 0,066 ± 0,019 | 0,064 ± 0,004 | 0,064 ± 0,004 |
| Контроль                                     | 0,052 ± 0,004 | 0,058 ± 0,002 | 0,062 ± 0,005 |
| <b>QT (с)</b>                                |               |               |               |
| ГК   | 0,048 ± 0,002 | 0,050 ± 0,000 | 0,040 ± 0,000 |
| ГД   | 0,048 ± 0,002 | 0,048 ± 0,004 | 0,038 ± 0,004 |
| Контроль                                     | 0,050 ± 0,000 | 0,046 ± 0,002 | 0,044 ± 0,002 |
| <b>QRS (с)</b>                               |               |               |               |
| ГК   | 0,020 ± 0,000 | 0,020 ± 0,000 | 0,020 ± 0,000 |
| ГД   | 0,020 ± 0,000 | 0,018 ± 0,002 | 0,012 ± 0,002 |
| Контроль                                     | 0,018 ± 0,002 | 0,018 ± 0,000 | 0,020 ± 0,000 |

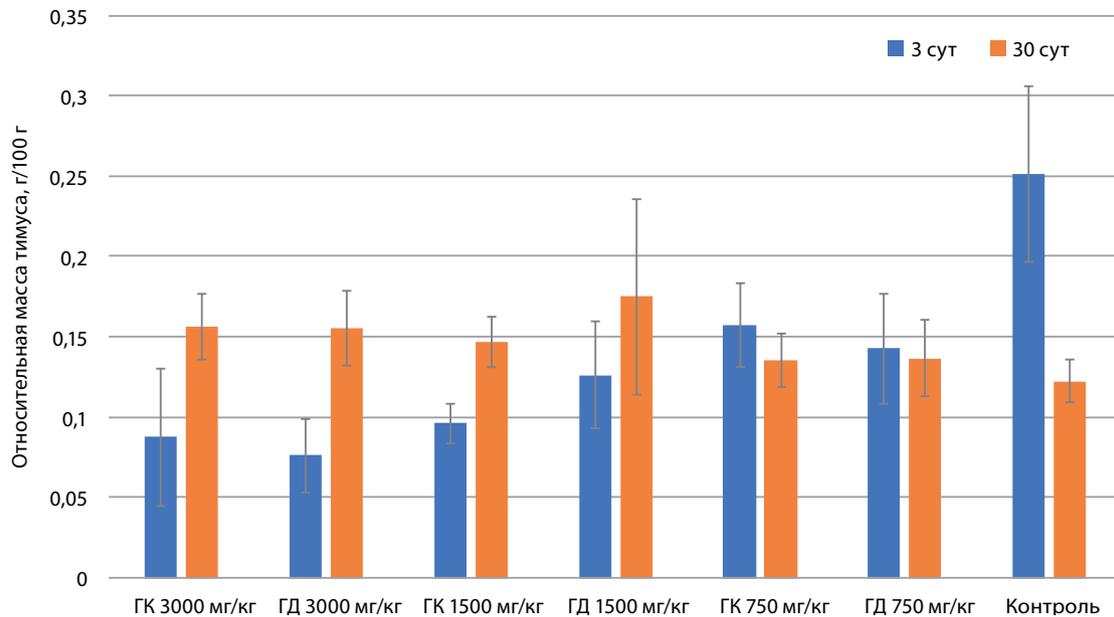


Рис. 5. Относительная масса тимуса

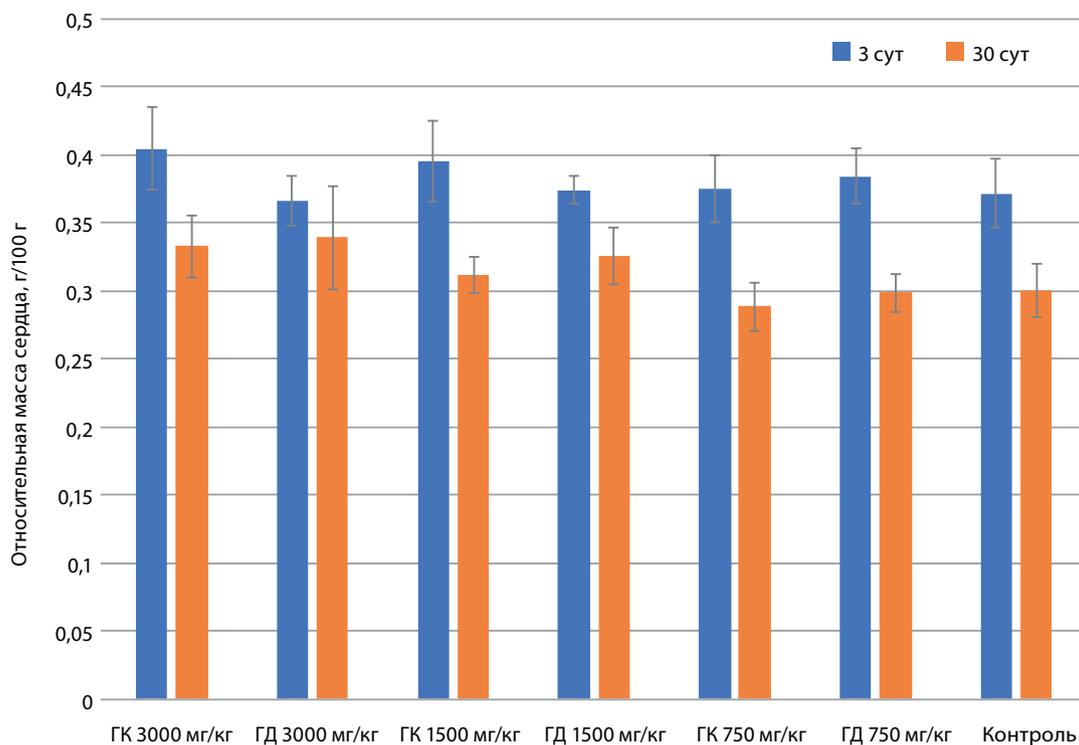


Рис. 6. Относительная масса сердца

массы данных органов у контрольных животных (рис. 5, 6).

#### Заключение

На основании результатов, полученных при сравнительном изучении хронической токсичности ГК

и ГД после перорального ежедневного 5-кратного применения на крысах, установлено, что изученные препараты практически аналогичны по показателям количественной и качественной токсичности (клиническая картина интоксикации, летальность, биомаркеры токсичности, морфометрия органов).

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

1. Лепешко П.Н. Особенности нормирования фармакологической субстанции гидроксикарбамид. В кн.: Новые исследования молодых ученых – 2017: сборник рецензируемых научных работ. Под ред. А.В. Сикорского, О.К. Дорониной. Минск: БГМУ, 2017. С. 66–73. [Lepeshko P.N. Features of the regulation of the pharmacological substance hydroxycarbamide. In: New Studies of Young Scientists – 2017: a collection of peer-reviewed scientific papers. Ed. by A.V. Sikorsky, O.K. Doronina. Minsk: Belarusian State Medical University, 2017. Pp. 66–73. (In Russ.)].
2. Лепешко П.Н., Соболев Ю.А. Токсикологическая оценка фармакологической субстанции гидроксикарбамид. В кн.: Материалы 17-й международной научной конференции «Сахаровские чтения 2017 года: экологические проблемы XXI века», Минск, 18–19 мая 2017 г. Минск: ИВЦ Минфина 2017. С. 184–5. [Lepeshko P.N., Sobol Yu.A. Toxicological assessment of the pharmacological substance hydroxycarbamide. In: Materials of the 17<sup>th</sup> International Scientific Conference “Sakharov Readings 2017: Environmental Problems of the XXI Century”, Minsk, May 18–19, 2017. Minsk: ITC Ministry of Finance, 2017. Pp. 184–5. (In Russ.)].
3. Brunner R.L., McLean M., Vorhees C.V., Butcher R.E. A comparison of behavioral and anatomical measures of hydroxyurea induced abnormalities. *Teratology* 1978;18(3):379–84. DOI: 10.1002/tera.1420180312. PMID: 741390.
4. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. *Качественная клиническая практика* 2002;(1):58–61. [Bolshakov O.P., Neznanov N.G., Babakhanyan R.V. Didactic and ethical aspects of research on biomodels and laboratory animals. *Kachestvennaya klinicheskaya praktika = Good Clinical Practice* 2002;(1):58–61. (In Russ.)].
5. Методические указания по изучению общетоксического действия противоопухолевых фармакологических средств. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2005. С. 170–204. [Methodological instructions for studying the general toxic effects of antitumor drugs. In: Guide to experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Ed. by R.U. Khabriev. 2<sup>nd</sup> edn., revised and additional. Moscow: Medicine, 2005. Pp. 170–204. (In Russ.)].
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012. С. 13–24. [A guide to preclinical drug research. Ed. by A.N. Mironov. Part 1. Moscow: Grif and Co, 2012. Pp. 13–24. (In Russ.)].
7. Принципы надлежащей лабораторной практики. Национальный стандарт Российской Федерации (ГОСТ 53434–2009). М.: Стандартиформ, 2010. [Principles of Good Laboratory Practice. National Standard of the Russian Federation (GOST 53434–2009). Moscow: Standartinform, 2010. (In Russ.)].
8. Об утверждении Правил лабораторной практики. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 1 апреля 2016 г. № 199н. [On approval of the Rules of Laboratory Practice. Order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation from 01 April 2016 No. 199n. (In Russ.)].
9. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. 2-е изд., доп. М., 2008. 196 с. [Gus'kova T.A. Toxicology of medicines (second edition supplemented). Moscow, 2008. 196 p. (In Russ.)].

**ORCID авторов/ORCID of authors**

Н.Ю. Кульбачевская/N.Yu. Kulbachevskaya: <https://orcid.org/0000-0003-4214-3475>

В.А. Чалей/V.A. Chaley: <https://orcid.org/0000-0001-7867-2868>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

# СТАДИЯ ТЕРМОЦИКЛИРОВАНИЯ В ОПТИМИЗАЦИИ ПРОЦЕССОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ В ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА

Е. В. Блынская, С. В. Тишков, К. В. Алексеев, С. В. Минаев

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

Контакты: Сергей Валерьевич Тишков [sergey-tishkov@ya.ru](mailto:sergey-tishkov@ya.ru)

**Введение.** В технологии лиофилизации стадия замораживания играет ключевую роль: она определяет время первичной сублимации, вторичной десорбции и зачастую внешний вид лиофилизата. Длительность лиофилизации связана с составом и условиями замораживания через параметр сопротивления массопереносу, который зависит от размера кристаллов льда.

**Цель исследования** – осуществить подбор температурных режимов термоциклирования («отжига») для получения наиболее паропроницаемого сублимационного слоя, рассчитать значение сопротивления массопереносу воды и выбрать оптимальный режим лиофилизации для приготовления лиофилизата ГК-2 для приготовления растворов для инъекций.

**Материалы и методы.** Субстанция: ГК-2 (гексаметиленамид бис-(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина)) (ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В. В. Закусова», Россия); вспомогательные вещества, предназначенные для парентерального применения: лиопротектор – сахароза (CompriSugar®) (CristalUnion, Франция), криопротектор – полиэтиленгликоль 4000 (ПЭГ, макрогол) (Polyglykol® 4000, Panreac, Испания). Лиофильная сушилка Edwards EF-6 (Италия); микроскоп Nikon Eclipse E200; цифровая камера Nikon DS-Ri2; конфокальный микроскоп LEXT OLS 4100. В работе использованы различные режимы замораживания, лиофилизации, прямая оптическая микроскопия в холодной камере, лазерная микроскопия и математические формулы для определения значений сопротивления массопереносу водяного пара модельных лиофилизатов.

**Результаты.** Рассмотрены возможности оптимизации этапа замораживания и соответственно всего цикла лиофилизации путем введения промежуточной стадии термоциклирования, приведены расчеты коэффициента сопротивления массопереносу состава при различных условиях замораживания и размерах кристаллов льда.

**Заключение.** Определено упрощенное уравнение расчета коэффициента сопротивления массопереносу для модельных растворов ГК-2 на основе корреляционной зависимости. Осуществлен подбор режимов замораживания и «отжига» исходя из наиболее важных показателей, таких как производительность и время лиофилизации.

**Ключевые слова:** стадия замораживания, лиофилизация, размеры кристаллов льда, термоциклирование, «отжиг»

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-87-94

## THERMAL CYCLING STAGE IN THE OPTIMIZATION OF THE FREEZING PROCESSES IN THE TECHNOLOGY OF DRUG LYOPHILIZED

E. V. Blynskaya, S. V. Tishkov, K. V. Alekseev, S. V. Minaev

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

**Introduction.** In the lyophilization technology, the freezing stage plays a key role in determining the time of primary sublimation, secondary desorption, and often the appearance of the lyophilisate. The duration of lyophilization is related to the composition and freezing conditions through the parameter resistance to mass transfer, which depends on the size of ice crystals.

**Objective:** to select temperature regimes of thermal cycling (“annealing”) to obtain the most vapor-permeable sublimation layer, calculate the value of resistance to mass transfer of water and select the most optimal lyophilization mode for preparing lyophilisate GK-2 for preparing solutions for injections.

**Materials and methods.** Substance: GK-2 (hexamethyleneamide bis-(N-monosuccinyl-L-glutamyl-L-lysine)) (V. V. Zakusov Research Institute of Pharmacology, Russia); excipients intended for parenteral use: lyoprotector – sucrose (CompriSugar®) (CristalUnion, France), cryoprotector – polyethylene glycol 4000 (PEG, macrogol) (Polyglykol® 4000, Panreac, Spain). Edwards EF-6 Lyophilic Dryer (Italy); microscope Nikon Eclipse E200; digital camera Nikon DS-Ri2; confocal microscope LEXT OLS 4100. Various freezing, lyophilization, direct optical microscopy in a cold chamber, laser microscopy and mathematical formulas were used to determine the values of resistance to mass transfer of water vapor from model lyophilisates.

**Results.** This article discusses the possibilities of optimizing the freezing stage and, accordingly, the entire lyophilization cycle by introducing an intermediate thermal cycling stage, provides calculations of the mass transfer coefficient of the composition under different freezing conditions and ice crystal sizes.

**Conclusion.** A simplified equation for calculating the coefficient of resistance to mass transfer for model solutions of GK-2 based on the correlation dependence was determined. The selection of freezing and “annealing” modes was carried out on the basis of the most important indicators, such as productivity and time of lyophilization.

**Key words:** freezing stage, lyophilization, ice crystal size, thermocycling, “annealing”

### Введение

Одним из самых распространенных методов стабилизации фармацевтических субстанций (ФС) пептидной природы при разработке инъекционных препаратов является лиофилизация [1, 2]. В связи с тем, что в процессе лиофилизации происходит удаление растворителя из замороженного состояния, не происходит термической деструкции молекул пептидной природы, в то же время полученная готовая лекарственная форма (ЛФ) обладает устойчивостью к гидролизу и может храниться более длительное время, чем традиционные жидкие ЛФ [3–5]. Поэтому лиофилизация выбрана в качестве метода получения готовой ЛФ при разработке состава и технологии ЛФ для инъекционного применения нейропротекторного действия с ФС, разработанной в ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» под руководством Т.А. Гудашевой в отделе химии лекарственных средств и имеющей шифр ГК-2 [6]. Лيوфилизация, несмотря на преимущества, обеспечиваемые ЛФ, является сложным, многоэтапным, экономически затратным процессом, при котором необходим тщательный подбор не только состава, количества растворителя, но и режимов лиофилизации, особенно стадии замораживания, поскольку она определяет скорость всех последующих процессов.

На стадии замораживания определяются размер кристаллов льда, их расположение, гомогенность, что в свою очередь будет характеризовать размер пор, извилистость и в конечном итоге паропроницаемость или обратное значение, сопротивление массопереносу.

Представленные значения имеют особую важность, поскольку определяют длительность дальнейших стадий лиофилизации, первичной сублимации и десорбции. А в связи с длительностью и энергозатратностью процесса особое значение имеют технологические приемы по уменьшению удельного сопротивления массопереносу и соответственно времени сублимации и десорбции. К наиболее распространенным методам относится подбор температурных режимов замораживания, т. е. оптимизация скорости замораживания для получения более крупных кристаллов, однако из-за стохастической природы процесса образования кристаллов льда возникает неомогенная морфология и более мелкие кристаллы льда сосредотачиваются в верхней и нижней частях флакона. Поэтому все более часто в тех-

нологии лиофилизации начинает использоваться промежуточная стадия «отжига», или термоциклирования, которую проводят после замораживания раствора для укрупнения и гомогенизации кристаллов льда, уменьшения сопротивления массопереносу и времени сублимации.

«Отжиг», или термоциклирование, составляет процесс, в котором происходит постепенное нагревание и подплавление образовавшихся кристаллов льда и затем по достижении определенной температуры повторная заморозка лиофилизата, при которой кристаллы льда замораживаются вокруг оставшихся замороженными центров кристаллизации. К тому же обработка «отжигом» часто уменьшает феномен агрегации белков и пептидов и увеличивает коэффициент восстановления активности белков и пептидов [7, 8], а также уменьшает время регидратации лиофилизатов.

Поэтому основная **цель** настоящей **работы** – подобрать температурные режимы «отжига» для получения наиболее паропроницаемого сублимационного слоя, рассчитать значение сопротивления массопереносу воды и выбрать наиболее оптимальный режим лиофилизации для приготовления ЛФ.

### Материалы и методы

#### Используемые материалы

Субстанция: ГК-2 (гексаметиленамид бис-(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина)) (ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Россия); вспомогательные вещества, предназначенные для парентерального применения: лиопротектор – сахароза (CompriSugar®) (CristalUnion, Франция), криопротектор – полиэтиленгликоль 4000 (ПЭГ, макрогол) (Polyglykol® 4000, Panreac, Испания).

Эксперименты по замораживанию проводили с использованием модельного состава ГК-2: сахароза: ПЭГ 4000 в соотношении 1:20:80 мг во флаконах из дроба объемом 5 мл с диаметром 16 мм и средней толщиной дна в самой узкой части 1,1 мм (ВИП-С-МЕД, Россия). Каждый флакон заполняли 1 мл композиции, что приводило к высоте заполнения 8 мм для всех циклов лиофилизации.

#### Используемое оборудование

Леофильная сушилка Edwards EF-6 (Италия); микроскоп Nikon Eclipse E200; цифровая камера Nikon DS-Ri2; конфокальный микроскоп LEXT OLS 4100.

### Используемые методики

*Режимы замораживания.* Флаконы подвергали замораживанию в 2 режимах:

- замораживание до  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  при скорости  $0,383\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  (режим 1);
- замораживание с предварительно охлажденными полками до  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  при  $1,15\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  (режим 2).

Затем заполненные флаконы помещали внутрь лабораторной лиофильной сушилки и для каждой скорости замораживания использовали 3 режима «отжига»:

- «отжиг» в течение 3 ч при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (режим «отжига» 1);
- «отжиг» в течение 1 ч при  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  (режим «отжига» 2);
- двойной «отжиг» в течение 1,5 ч на каждую температурную точку при температурах  $-20$  и  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  (режим «отжига» 3).

*Цикл лиофилизации.* Для определения взаимосвязи между морфологией кристаллов льда, морфологией лиофилизатов и временем первичной сублимации цикл сублимационной сушилки проводили в лабораторном лиофилизаторе.

Партию в 50 флаконов загружали на полку сублимационной сушилки и применяли следующий цикл лиофилизации: охлаждение до  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , в зависимости от режима замораживания занимающее 1–3 ч ( $0,383$  и  $1,15\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ), и изотермическое плато в течение 2 ч; сублимация при температуре полки  $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$  и общем давлении газа  $P = 6,8\text{--}8,0 \times 10^{-2}$  мбар для этапа первичной сублимации; вторичная стадия десорбции при температуре полки  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  (длительность определялась в зависимости от времени первичной сублимации) и общем давлении газа  $P = 5,9\text{--}6,0 \times 10^{-2}$  мбар.

*Прямая оптическая микроскопия в холодной камере.* Выбранный метод характеристики структуры кристаллов льда – прямая оптическая микроскопия в холодной камере – зарекомендовал себя в фармацевтической технологии. Этот метод предпочтительнее криоСЭМ из-за его низкой стоимости, простоты реализации, а также потому, что он лучше сохраняет исходную структуру замороженного материала. При этом не требуется никаких крепежных средств или криосодержащих агентов для подготовки образца и, в отличие от метода криоСЭМ, нет необходимости в высушивании образцов [9].

Особенности методики в том, что замороженный образец подготавливали микротомом (прибор для приготовления тонких срезов для микроскопического исследования), а затем его наблюдали под микроскопом в холодной камере, поддерживаемой при  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Изображения, полученные цифровой камерой, записаны, обработаны и проанализированы с помощью программ Visilog и Scion. Значения среднего диаметра рассчитывали путем оценки поверхности эквивалентного круга, который имел ту же поверх-

ность, что и одна частица, схематизированная как многоугольник правильной формы. Для получения приемлемой воспроизводимости распределения средних диаметров кристаллов льда образцы исследовали сверху, в средней части и на дне.

*Лазерная микроскопия и построение 3D-модели поверхности лиофилизата.* Для оценки результатов оптической микроскопии значения диаметров кристаллов льда сравнивали со значениями среднего диаметра пор, оцененными по параметрам структуры лиофилизата, а именно пористости. Высушенные лиофилизаты исследовали лазерной микроскопией, в результате которой строилась 3D-модель срезов и структура образовавшихся ячеек сравнивалась с морфологией кристаллов льда.

Проницаемость лиофилизата в конце периода первичной сушилки также оценивали по экспериментальным средним скоростям сублимации и строили корреляционную кривую со средними диаметрами кристалла льда, ранее определенными с помощью оптической микроскопии.

*Определение сопротивления массопереносу.* Экспериментальные значения сопротивления массопереносу водяного пара через сухой слой, обозначенного  $R_p$ , рассчитывали по скоростям сублимации и по средним значениям температуры продукта путем применения следующего соотношения:

$$R_p = \frac{A_s(P_i - P_{chamber})}{\dot{m}}, \quad (1)$$

где  $m$  – средняя скорость сублимации для одного флакона;  $P_i$  – давление водяного пара на фронте сублимации, предполагаемое в равновесии с оценкой температуры в этой точке;  $P_{chamber}$  – общее давление газа в камере, измеренное датчиком общего давления (давление воды в камере считалось равным общему давлению);  $A_s$  – площадь сублимации для одного флакона, равная внутренней прямой площади поверхности флакона. Значения  $P_i$  рассчитывались по средней температуре продукта. Средняя скорость сублимации для одного флакона  $m$  определялась из общей потери массы флакона и полного времени сублимации, указанного гигрометром по средней точке резкого снижения давления воды.

Более того, из теории молекулярной диффузии в режиме Кнудсена теоретические значения сопротивления массопереносу водяного пара определялись следующим соотношением:

$$R_p = \frac{RTe'_{c,s}}{M_{water}D_{k,e}} + R_{p0} = \frac{1,5e_{c,s}}{d_p} \left( \frac{T}{\varepsilon} \right) \sqrt{\left( \frac{\pi RT}{2M_{water}} \right)} + R_{p0}, \quad (2)$$

где  $T$  – средняя температура продукта при сублимации, равная  $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $\varepsilon = 0,9$  для пористости

лиофилизата;  $\tau$  – коэффициент извитости, значение которого было найдено равным 1,5 по данным литературы для подобных составов [9];  $R_{p0}$  – поправочный член, интерпретируемый как сопротивление массопереносу в нулевом пористом слое ( $e_{cs} = 0$ ) из-за поверхностных эффектов.

### Результаты и обсуждение

#### Влияние режимов «отжига»

Основной задачей «отжига», помимо дополнительной кристаллизации лиофилизируемой смеси, является увеличение размера кристаллов (пор) при лиофилизации, соответствующая оптимизация про-

цесса и уменьшение времени цикла сублимации, поэтому для подбора оптимального режима лиофилизации ГК-2 использовали «отжиг» в сочетании с 2 режимами замораживания: «быстрым» и «медленным».

На рис. 1 и 2 представлены интегральные кривые усредненных значений кристаллов льда при распределении в верхней части образца, на его дне и в средней части для 3 режимов «отжига»: 1-й – при  $-10^\circ\text{C}$  в течение 1 ч, 2-й – при  $-20^\circ\text{C}$  в течение 3 ч, 3-й режим использовал двойную систему «отжига» – при  $-20^\circ\text{C}$  в течение 1,5 ч и при  $-10^\circ\text{C}$  в течение 1,5 ч. Данные, полученные с помощью режимов замораживания 1 и 2,

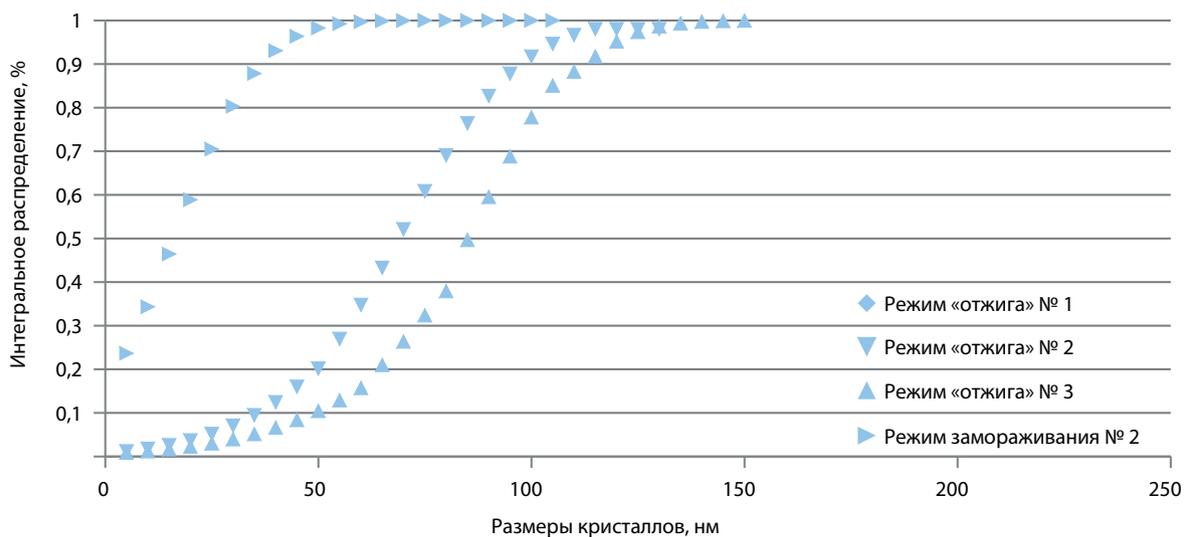


Рис. 1. Интегральные кривые распределения средних размеров кристаллов льда при режиме замораживания 1 и различных режимах «отжига»; флаконы из дробта по 5 мл

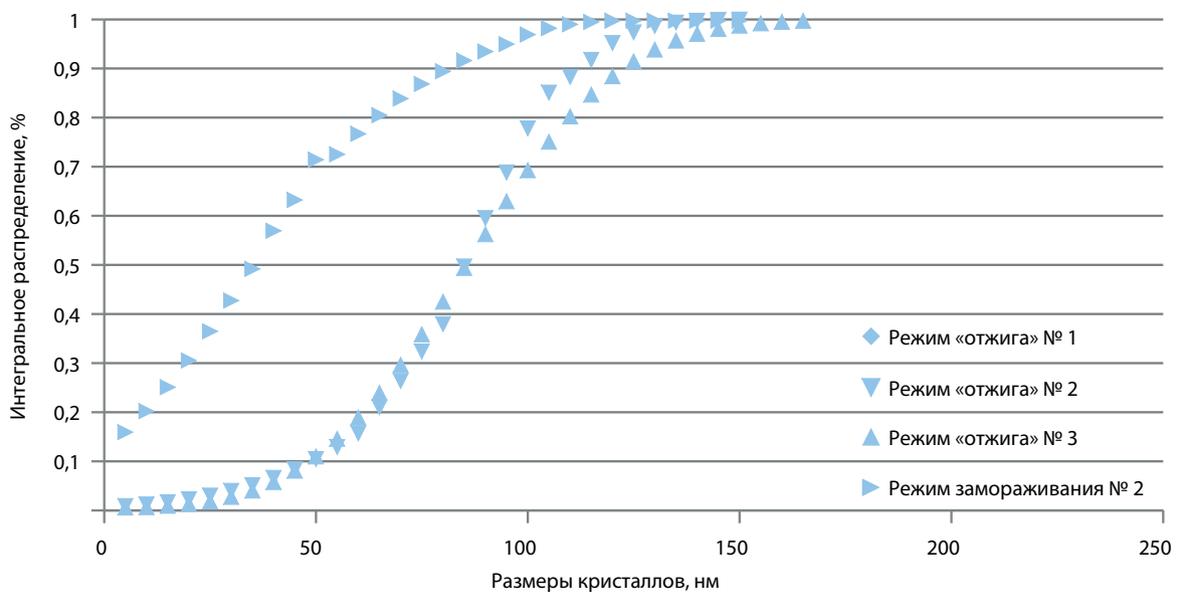
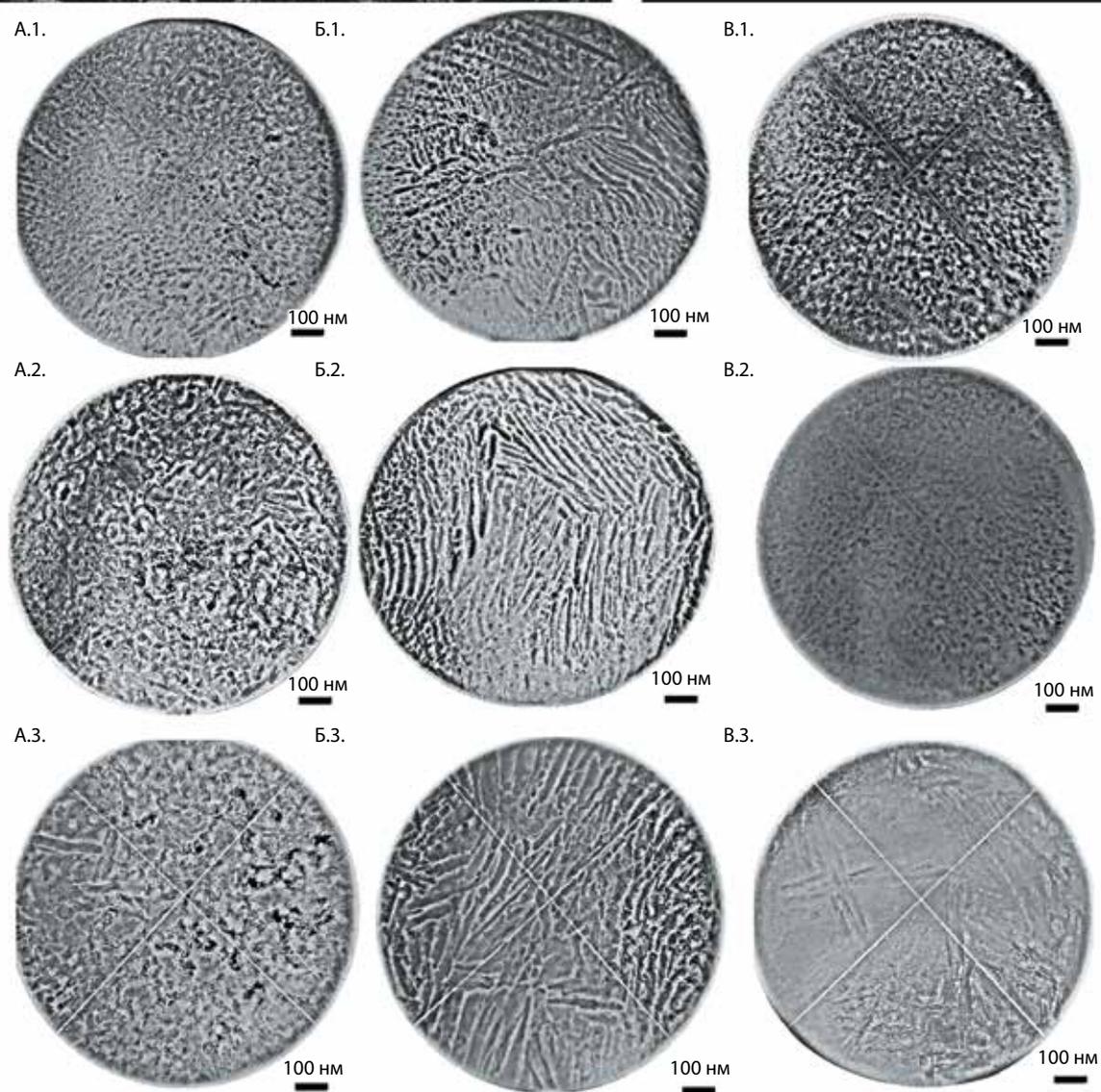


Рис. 2. Интегральные кривые распределения средних размеров кристаллов льда при режиме замораживания 2 и различных режимах «отжига»; флаконы из дробта по 5 мл



**Рис. 3.** Влияние режимов «отжига» на структуру кристаллов льда: А – режим «отжига» 2 и «быстрый» режим замораживания; Б – режим «отжига» 2 и «медленный» режим замораживания; В – «медленный» режим замораживания без «отжига»; 1, 2, 3 – соответственно верхняя, средняя и нижняя часть флакона

показывают, что «отжиг» оказывает пропорциональное воздействие на размеры кристаллов льда при обоих режимах замораживания и соответственно при разных размерах кристаллов льда. Поэтому для выбора режима «отжига» необходимо опираться только на сравнительные данные.

Таким образом, в среднем для условий «отжига» проиллюстрировано (рис. 3) увеличение средних размеров кристаллов льда на 30 мкм и значительный эффект гомогенизации ледовой морфологии по всей высоте флакона, причем этот рост был выше в нижней части флакона (50 мкм), чем в верхней (20 мкм) (см. рис. 3 (1, 3)). Эффект гомогенизации и увеличения размеров кристаллов льда наиболее существенно проявлен при 3-м режиме «отжига» вне зависимости

от режимов замораживания, поэтому для оптимизации режима замораживания можно рекомендовать двойной «отжиг» (1,5 ч при  $-20^{\circ}\text{C}$  и 1,5 ч при  $-10^{\circ}\text{C}$ ), однако ввиду длительности и трудоемкости самого процесса двойного «отжига» и оптимального результата, полученного при режиме 2, необходимо провести сравнение времени первичной и вторичной сублимации, а также времени и производительности лиофилизации для всех режимов замораживания и «отжига» (см. таблицу).

При подборе режима замораживания учитывали эффект гомогенизации, оказывающий благоприятное влияние на проницаемость высушенного слоя и, наконец, на время сублимации, однако на основе представленных данных сделан вывод о предпочтительном

Средние размеры кристаллов льда и корреляция с временем сублимации и производительностью флаконов с лиофилизатом

| Режимы замораживания | Режимы «отжига» | Основной размер кристаллов льда, нм | Скорость сублимации, мг/(м <sup>2</sup> с) | Среднее время первичной сублимации, ч | Средняя общая длительность цикла лиофилизации, ч | Производительность флаконов за цикл лиофилизации в час, фл/ч |
|----------------------|-----------------|-------------------------------------|--|---------------------------------------|--|--|
| Режим 1              | Режим 1         | 147 ± 5,88                          | 226,07 ± 9,04                              | 5,5 ± 0,22                            | 25 ± 1,00  | 20 ± 0,80  |
|                      | Режим 2         | 165 ± 6,60                          | 248,68 ± 9,95                              | 5 ± 0,20                              | 22 ± 0,88  | 22,72 ± 0,91   |
|                      | Режим 3         | 208 ± 8,32                          | 310,85 ± 12,43                             | 4 ± 0,16                              | 23 ± 0,92  | 21,73 ± 0,87   |
| Режим 2              | Режим 1         | 123 ± 4,92                          | 191,30 ± 7,65                              | 6,5 ± 0,26                            | 25 ± 1,00  | 20 ± 0,80  |
|                      | Режим 2         | 134 ± 5,36                          | 207,23 ± 8,29                              | 6 ± 0,24                              | 22 ± 0,88  | 22,72 ± 0,91   |
|                      | Режим 3         | 163 ± 6,52                          | 248,68 ± 9,95                              | 5 ± 0,20                              | 23 ± 0,92  | 21,73 ± 0,8692   |
| Режим 1              | —               | 113 ± 4,52                          | 177,63 ± 7,11                              | 7 ± 0,28                              | 24 ± 0,96  | 20,83 ± 0,83   |
| Режим 2              | —               | 99 ± 3,96                           | 155,42 ± 6,22                              | 8 ± 0,32                              | 24 ± 0,96  | 20,83 ± 0,83   |

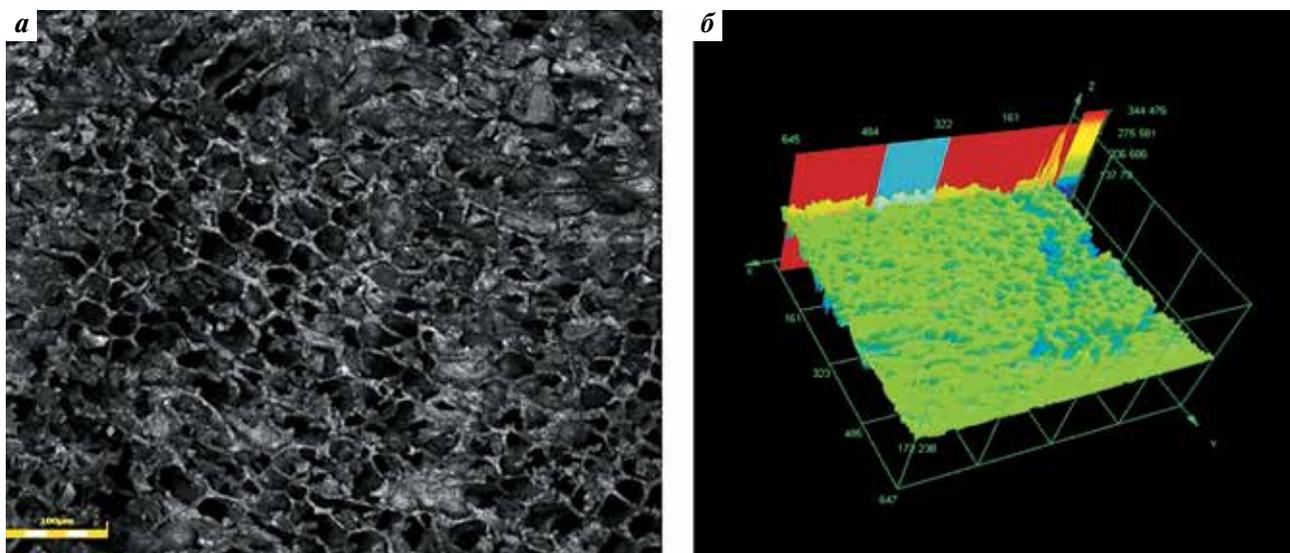


Рис. 4. Лазерная оптическая микроскопия лиофилизата (а), компьютерная 3D-модель структуры пор среза (б)

использовании при лиофилизации режима «отжига» 2 в комбинации с различными режимами замораживания, поскольку данный режим обеспечивает наилучшую производительность лиофилизации при наименьших затратах времени на охлаждение, несмотря на различные скорости замораживания.

#### Морфология лиофилизированного слоя. Интерпретация и моделирование массопереноса воды

Характеристики морфологии лиофилизированной матрицы влияют на устойчивость к переносу массы водяного пара, обозначаются  $R_p$  и определяются уравнением (1), обратно пропорциональным проницаемости высушенного слоя. Данное заключение исходило из наблюдавшегося равенства между средними размерами пор в лиофилизате, которые

вычисляли путем построения компьютерной 3D-модели на основе лазерной микроскопии (рис. 4), и средними размерами ледяного кристалла. Значения сопротивления массопереносу водяного пара для различных условий замораживания оценивали по средним значениям скорости сублимации, вычисленным по формуле (1), и средним размерам кристаллов льда, полученным с помощью оптической микроскопии в холодной камере.

Представленные данные, которые соответствуют максимальной толщине сухого слоя, равной 8 мм, в конце периода сублимации, нанесены на инверсию средних размеров кристаллов льда на рис. 5. Таким образом, на графике показана линейная зависимость между этими 2 параметрами, которые могут быть скоррелированы следующим уравнением (единицы СИ):

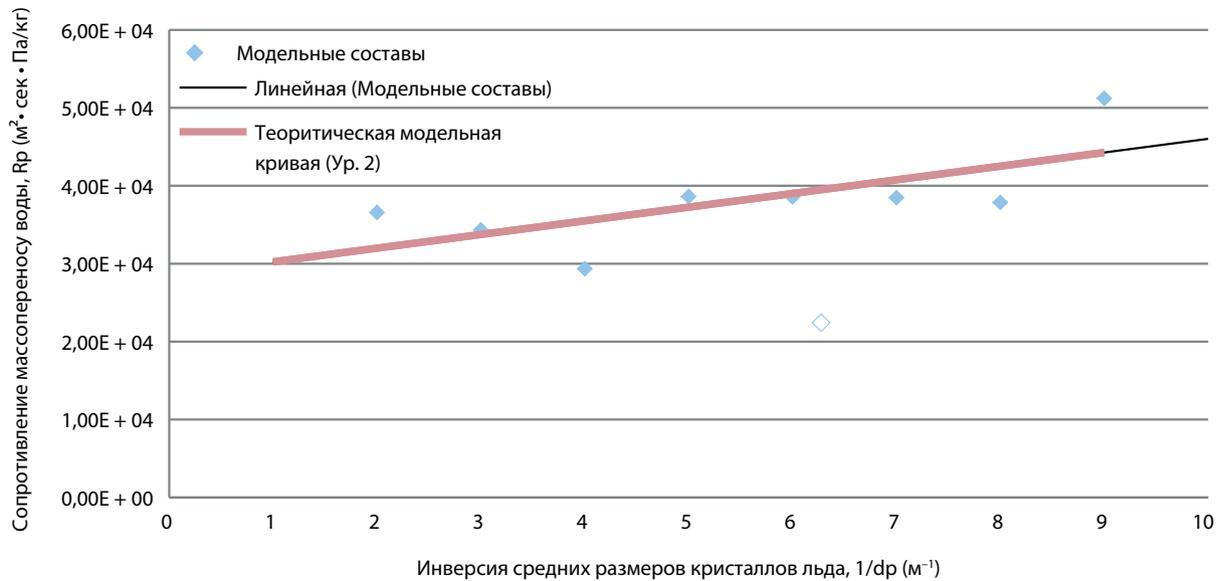


Рис. 5. Зависимость средних значений сопротивления массопереносу водяного пара от среднего диаметра пор. Экспериментальные и теоретические значения по формуле (2) (сплошная линия)

$$R_p = \frac{0,0309}{d_p} + 15500, (3)$$

где  $R_p$  выражается в  $\text{м}^2 \cdot \text{с} \cdot \text{Па} / \text{кг}$  и средний диаметр пор  $d_p$  в м. Эмпирическая корреляция соответствует толщине лиофилизированного слоя ( $h = 8$  мм), подтверждает пропорциональность экспериментальных значений сопротивления массопереносу водяного пара с инверсией средних диаметров кристаллов льда, т. е. обратно пропорциональна средним значениям диаметров пор. Представленное уравнение позволяет рассчитать значения сопротивления массопереносу в случае изменений размеров кристаллов льда при переносе технологии на другое производственное оборудование и корректировании температурных режимов замораживания лиофилизатов.

### Заключение

Проведены исследования и оптимизация этапа замораживания в цикле лиофилизации ЛФ для парентерального применения с ФС ГК-2. Получены усредненные значения размеров кристаллов льда для разных режимов замораживания и «отжига», рассчитаны значения сопротивления массопереносу и соответствующее время сублимации образцов. Осуществлен подбор режимов замораживания и «отжига» исходя из наиболее важных показателей, таких как производительность и время лиофилизации. Рассчитано уравнение на основе построенной эмпирической корреляционной зависимости для данного модельного состава, позволяющее корректировать технологию лиофилизации при использовании оборудования разных типов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Гулякин И.Д., Хашем А., Николаева Л.Л. и др. Разработка новой технологии получения лекарственной формы для внутривенного введения производного индолакарбазола ЛХС-1208. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(2):55–60. [Gulyakin I.D., Hashem A., Nikolaeva L.L. et al. Development of a dosage form for the intravenous administration of an indole carbazole derivative LHS-1208. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2016;15(2):55–60. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-55-60.
2. Аршинова О.Ю., Оборотова Н.А., Санарова Е.В. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации лекарственных препаратов. Разработка и регистрация лекарственных средств 2013;(2):20–5. [Arshinova O.Yu., Oborotova N.A., Sanarova E.V. Auxiliary substances in the technology of lyophilization of drugs. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* = Development and Registration of Medicines 2013;(2):20–5. (In Russ.)].
3. Блынская Е.В., Тишков С.В., Алексеев К.В., Марахова А.И. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации пептидов и белков. Фармация 2017;66(1):14–8. [Blynskaya E.V., Tishkov S.V., Alekseev K.V., Marakhova A.I. Auxiliary substances in the technology of lyophilization of peptides and proteins. *Farmatsiya* = Pharmacy 2017;66(1):14–8. (In Russ.)].
4. Блынская Е.В., Тишков С.В., Алексеев К.В. Технологические подходы к совершенствованию процесса лиофилизации белковых и пептидных

- лекарственных препаратов. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(1):6–11. [Blynskaya E.V., Tishkov S.V., Alekseev K.V. Technological approaches to improving the process of lyophilization of protein and peptide drugs. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2017;16(1):6–11. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-6-11.
5. Блынская Е. В., Тишков С. В., Алексеев К. В., Минаев С. В. Математическое моделирование этапа замораживания в технологии лиофилизированных лекарственных форм. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(2):15–21. [Blynskaya E.V., Tishkov S.V., Alekseev K.V., Minaev S.V. Mathematical modeling of the freezing stage in the technology of lyophilized drug forms. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(2):15–21. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-15-21.
6. Поварнина П. Ю., Воронцова О. Н., Гудашева Т. А. и др. Оригинальный дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2 восстанавливает нарушенные когнитивные функции в крысиных моделях болезни Альцгеймера. Acta Naturae (русскаяязычная версия) 2013;5(3):48–52. [Povarnina P.Yu., Vorontsova O.N., Gudashева T.A. et al. The original dipeptide mimetik of the nerve growth factor GK-2 restores impaired cognitive functions in rat models of Alzheimer's disease. Acta Naturae (Russian version) 2013;5(3):48–52. (In Russ.)].
7. Hottot A., Vessot S., Andrieu J. Freeze drying of pharmaceuticals in vials: Influence of freezing protocol and sample configuration on ice morphology and freeze-dried cake texture. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification 2007;46(7):666–74. DOI: 10.1016/j.cep.2006.09.003.
8. Serp D., Mueller M., von Stockar U., Marison I.W. Low-temperature electron microscopy for the study of polysaccharide ultrastructures in hydrogels. II. Effect of temperature on the structure of Ca<sup>2+</sup>-alginate beads. Biotechnol Bioeng 2002;79(3):253–9. DOI: 10.1002/bit.10287. PMID: 12115413.
9. Caillet A., Cogné C., Andrieu J. et al. Characterization of ice cream structure by direct optical microscopy. Influence of freezing parameters. LWT - Food Science and Technology 2003;36(8):743–9. DOI: 10.1016/S0023-6438(03)00094-X.

**ORCID авторов/ORCID of authors**

С. В. Тишков/S.V. Tishkov <https://orcid.org/0000-0002-8321-6952>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

# ТЕСТ «РАСТВОРЕНИЕ» КАК ЭЛЕМЕНТ КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА КАПСУЛ, СОДЕРЖАЩИХ СЕКОИЗОЛАРИЦИРЕЗИНОЛ

Е.В. Игнатьева<sup>1</sup>, З.С. Шпрах<sup>1,2</sup>, И.В. Ярцева<sup>1</sup>, Е.В. Санарова<sup>1</sup>

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

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

**Контакты:** Елена Владимировна Игнатьева chem\_analysis@ronc.ru

**Введение.** Тест «Растворение» – один из основных методов оценки качества твердых дозированных лекарственных форм, который позволяет охарактеризовать лекарственный препарат как с технологической, так и с биофармацевтической точки зрения. Данное испытание также может использоваться для сравнительных исследований биодоступности лекарственных препаратов *in vitro*.

**Цель исследования** – разработка теста «Растворение» для лекарственного препарата «Секоизоларицирезинол, капсулы 100 мг». **Материалы и методы.** В работе использованы: «Секоизоларицирезинол, капсулы 100 мг»; кислота хлористоводородная (х. ч.); Твин-80 (Полисорбат LAUROPAN T/80, Италия); вода очищенная (рН 6,5); 0,1 М и 0,2 М растворы хлористоводородной кислоты; фосфатный буферный раствор (рН 6,8). Приборы и аппаратура: тестер для проверки растворения ERWEKA серии 700, тип – лопастная мешалка (ERWEKA, Германия); спектрофотометр регистрирующий Cary-100 (Varian, США); рН-метр HANNA рН 211 (Hanna Instruments, Германия); весы Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия).

**Результаты.** С учетом требований Государственной Фармакопеи XIV издания к твердым дозированным лекарственным формам разработана методика теста «Растворение» для лекарственного препарата «Секоизоларицирезинол, капсулы 100 мг».

**Выводы.** Выбраны оптимальные условия проведения испытания «Растворение» для капсул, содержащих 100 мг секоизоларицирезинола. Для количественной оценки высвобождения секоизоларицирезинола из капсул разработана аналитическая методика, позволяющая контролировать содержание фармацевтической субстанции в различных средах растворения. На основании полученных экспериментальных данных разработана методика теста «Растворение» для лекарственного препарата «Секоизоларицирезинол, капсулы 100 мг».

**Ключевые слова:** секоизоларицирезинол, капсулы, растворение, среда растворения, количественное определение

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-95-100

## TEST “DISSOLUTION” AS AN INTEGRAL PART OF QUALITY COMPLEX EVALUATION OF CAPSULES WITH SEKOISOLARICIRE SINOL

E. V. Ignatieva<sup>1</sup>, Z. S. Shprakh<sup>1,2</sup>, I. V. Yartseva<sup>1</sup>, E. V. Sanarova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

<sup>2</sup>Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation; Build. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

**Background.** Test “Dissolution” is one of the main methods for quality evaluation of solid dosage drug forms, which enables characterization of the drug both in technological and biopharmacological aspects. The test may be also used for comparative studies of drugs bioavailability *in vitro*.

**Objective.** Development of the “Dissolution” test for the drug Secoisolariciresinol, capsules 100 mg.

**Materials and methods.** The study used: Secoisolariciresinol, capsules 100 mg; hydrochloric acid (c. p.); Twin-80 (Polysorbate LAUROPAN T/80, Italy); purified water (pH 6.5); 0.1 M and 0.2 M solutions of hydrochloric acid; phosphate buffer solution (pH 6.8). Equipment and devices: dissolution tester ERWEKA, series 700, type – paddle mixer (ERWEKA, Germany); recording spectrophotometer Cary-100 (Varian, USA); pH-meter HANNA pH 211 (Hanna Instruments, Germany); analytical balances Sartorius 2405 (Sartorius AG, Germany).

**Results.** Methodology for performing the “Dissolution” test for the drug Secoisolariciresinol, capsules 100 mg was developed according to Russian State Pharmacopoeia (XIV) requirements for solid dosage drug forms.

**Conclusions.** Optimal conditions were chosen for performing the study “Dissolution” for capsules containing 100 mg of secoisolariciresinol. Analytical methodology was designed for quantitative assessment of secoisolariciresinol release from capsules, which enables accurate control of pharmaceutical substance content in different dissolution media. Methodology for the “Dissolution” test of the drug Secoisolariciresinol, capsules 100 mg was developed on the base of the obtained experimental data.

**Key words:** secoisolariciresinol, capsules, dissolution, dissolution medium, assay

### Введение

Тест «Растворение» является одним из основных аналитических испытаний для всех дозированных твердых лекарственных форм (ЛФ) для внутреннего применения (таблеток, драже, капсул, гранул) [1–4]. Данное испытание используется на протяжении всего жизненного цикла лекарственного препарата (ЛП): как при разработке лекарственного средства (ЛС) для выбора оптимального состава ЛФ, оценки качества готового ЛС и стабильности препарата, так и в процессе производства ЛС и при обращении на фармацевтическом рынке для гарантии постоянства качества. Особое место тест «Растворение» занимает в предварительной оценке биодоступности воспроизведенных ЛС при подтверждении биоэквивалентности.

Применение данного теста позволяет установить скорость и степень высвобождения действующего вещества в среду растворения из твердой дозированной ЛФ в нормируемых условиях [5, 6], что в некоторой степени имитирует поведение ЛФ в условиях желудочно-кишечного тракта человека.

Для инновационных ЛС разработка методик теста «Растворение» является наиболее сложным процессом, при этом дизайн исследований и их объем определяются физико-химическими и фармакокинетическими свойствами активного вещества. Выбор методики испытания должен учитывать результаты экспериментов на животных: полученные экспериментально основные фармакокинетические параметры лекарственного вещества позволяют обосновать условия проведения теста, прежде всего среду растворения. Технология производства и состав ЛФ определяют выбор прибора и гидродинамические параметры (скорость вращения аппарата) испытания. Нормы теста «Растворение» – время растворения (время отбора проб) и количество активного вещества, перешедшее в среду растворения к определенному моменту времени, – устанавливают на основании экспериментальных исследований в соответствии с требованиями Общей фармакопейной статьи «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» [7].

Оценка соотношения между полученными фармакокинетическими параметрами и нормами теста «Растворение» позволяет определить область применения методики: четкая корреляция между результатами экспериментов *in vitro* и *in vivo* может сделать в последующем необязательным проведение исследований биоэквивалентности в случае изменения состава ЛП или процесса его производства [8]. При отсутствии корреляции тест может служить только методом контроля качества препарата [4].

В настоящее время разработка теста «Растворение» невозможна без оценки характеристик активной суб-

станции в соответствии с биофармацевтической классификационной системой (БКС), предложенной G.L. Amidon и соавт. и принятой FDA, ВОЗ и ЕМА [9]. БКС – это система научной классификации, в которой фармацевтические субстанции разделены на 4 класса по важнейшим биофармацевтическим свойствам: растворимости в водных растворах и степени проницаемости через биомембрану [10]. Использование БКС позволяет разработать спецификации теста «Растворение» *in vitro*, способные выявлять изменения, которые могут влиять на эффективность и безопасность ЛС.

Природные полифенолы класса лигнанов хорошо известны в качестве природных антиоксидантов, проявляющих в зависимости от используемой дозы эстрогенную или антиэстрогенную активность [11, 12]. В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разработана ЛФ для одного из представителей этого класса соединений – секоизоларицирезинола (СЕКО), полученного выделением из сучковых зон лиственницы и пихты [13]. ЛФ СЕКО представляет собой твердые желатиновые капсулы, содержащие 100 мг активного вещества и вспомогательные вещества: крахмал, тальк, стеарат магния [14, 15].

Доклинические исследования препарата показали его высокую противоопухолевую эффективность на эстрогензависимых экспериментальных опухолях животных и подкожных ксенографтах рака молочной железы человека [16–18].

**Целью** настоящего исследования являлась разработка надежной и воспроизводимой методики теста «Растворение» для капсул, содержащих 100 мг СЕКО, в соответствии с требованиями Общей фармакопейной статьи «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» [7].

### Материалы и методы

**Препараты и реактивы.** СЕКО, капсулы 100 мг; кислота хлористоводородная (х. ч.); Твин-80 (Полисорбат LAUROPAN T/80, Италия).

При разработке методики использовали следующие среды растворения:

- вода очищенная (рН 6,5);
- 0,1 М и 0,2 М растворы хлористоводородной кислоты;
- фосфатный буферный раствор (рН 6,8);
- растворы Твина-80 в 0,1 М и 0,2 М растворах хлористоводородной кислоты.

**Приборы и аппаратура.** Тестер для проверки растворения ERWEKA серии 700, тип – лопастная мешалка (ERWEKA, Германия); спектрофотометр регистрирующий Cary-100 (Varian, США); рН-метр HANNA pH 211 (Hanna Instruments, Германия); весы Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия).

Скорости вращения лопастной мешалки: 50 и 100 об/мин.

Объемы растворителя: 500 и 900 мл.

Время отбора проб: от 45 до 120 мин.

Количественное определение СЕКО, высвободившегося из капсул в среду растворения, проводили методом прямой спектрофотометрии в одной временной точке [19].

### Результаты и обсуждение

Разработка методики теста «Растворение» включает в себя выбор среды растворения, типа тестера для проверки растворения, а также выбор подходящей гидродинамики (скорости вращения корзинки или лопасти).

Среду растворения для разработки методики теста выбирали с учетом свойств СЕКО в соответствии с БКС ЛС [9, 10].

СЕКО плохо растворим в воде и хлористоводородной кислоте. Доклинические исследования фармакокинетики препарата показали, что процесс прохождения СЕКО через органы желудочно-кишечного тракта после однократного перорального введения характеризуется высокой скоростью и полнотой всасывания. То есть препарат относится ко II классу БКС фармацевтических субстанций: вещество с низкой растворимостью в водных растворах и высокой проницаемостью через биомембраны. Для фармацевтических субстанций II класса тест «Растворение» *in vitro* наиболее полно отражает абсорбцию *in vivo*, поскольку для таких веществ стадия высвобождения активного вещества из ЛФ и растворения в физиологических средах в желудочно-кишечном тракте является лимитирующей для абсорбции в системный кровоток [20]. Изучение таких препаратов в тесте «Растворение» требует модификации среды растворения, так как применение буферных растворов не обеспечивает их высвобождение из ЛФ. Обычно в таком случае для создания оптимальной среды используют комбинацию кислоты или буферного раствора и низких концентраций поверхностно-активного вещества.

Важнейшей характеристикой среды являются условия предельного растворения: объем среды растворения должен превышать объем, необходимый для получения насыщенного раствора лекарственного вещества, по крайней мере в 3 раза, а оптимальный объем среды растворения может быть рассчитан из величины биофармацевтической растворимости субстанции для данной среды [5].

На начальном этапе исследования, принимая во внимание необходимость использования большого объема растворителя, в качестве среды растворения использовали воду, 0,1 М хлористоводородную кислоту и фосфатный буфер (объем растворителя — 500 мл). В соответствии с рекомендациями Государст-

венной Фармакопеи XIV (ГФ XIV) [21] испытание проводили при температуре 37 °С и скорости вращения лопастной мешалки 50 и 100 об/мин. Отбор пробы проводили через 45 мин. В этих условиях количество активного вещества, перешедшее в растворитель, оказалось незначительным и не удовлетворяло требованиям испытания (табл. 1).

**Таблица 1.** Результаты испытания «Растворение» для ЛФ «Секоизолярицирезинол, капсулы 100 мг» в водных средах

| Среда растворения                | Объем среды растворения, мл | Скорость вращения, об/мин | Время наблюдения, мин | Количество высвободившейся фармацевтической субстанции, % |
|----------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------|---|
| Вода                             | 500                         | 50                        | 45                    | 14,7  |
| 0,1 М хлористоводородная кислота | 500                         | 100                       | 45                    | 32,3  |
| Фосфатный буферный раствор       | 500                         | 100                       | 45                    | 28,1  |

**Примечание.** Результаты получены для серии 1 при температуре 37 °С.

Использование в качестве среды растворения 0,1 М хлористоводородной кислоты с одновременным увеличением объема растворителя до 900 мл позволило повысить выход фармацевтической субстанции в среду растворения почти в 2 раза; тем не менее и этот результат был неудовлетворительным. Более высокие значения высвобождения активного вещества были получены при применении 0,2 М хлористоводородной кислоты (около 50 % через 45 мин наблюдения и около 80 % через 120 мин наблюдения) (табл. 2).

**Таблица 2.** Результаты испытания «Растворение» для ЛФ «Секоизолярицирезинол, капсулы 100 мг» в водных растворах кислоты хлористоводородной

| Среда растворения                | Объем среды растворения, мл | Время наблюдения, мин | Количество высвободившейся фармацевтической субстанции, % |
|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------|---|
| 0,1 М хлористоводородная кислота | 900                         | 45                    | 48,3  |
|                                  | 900                         | 60                    | 56,7  |
|                                  | 900                         | 90                    | 65,0  |
|                                  | 900                         | 120                   | 73,7  |
| 0,2 М хлористоводородная кислота | 900                         | 45                    | 51,0  |
|                                  | 900                         | 90                    | 71,5  |
|                                  | 900                         | 120                   | 81,5  |

**Примечание.** Результаты получены для серии 1 при температуре 37 °С и скорости вращения лопастной мешалки 100 об/мин.

Для увеличения скорости высвобождения СЕКО в среду растворения добавляли неионогенное поверхностно-активное вещество Твин-80 [21]. В испытании использовали 0,2 % растворы Твина-80 в 0,1 М и 0,2 М хлористоводородной кислоте (табл. 3). Как видно из табл. 3, в обеих средах при увеличении времени отбора пробы до 2 ч количество СЕКО, высвободившегося в среду растворения, составило более 75 %. Оба раствора находились в физиологическом диапазоне рН (1,0–7,5).

**Таблица 3.** Результаты испытания «Растворение для ЛФ «Секо-изолацирезинол, капсулы 100 мг» в растворах Твина-80

| Среда растворения                  | Объем среды растворения, мл | Время наблюдения, мин | Количество высвободившейся фармацевтической субстанции, % |
|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------|---|
| Твин-80, 0,2 % водный раствор      | 900                         | 45                    | 49,1  |
| Твин-80, 0,2 % раствор в 0,1 М HCl | 900                         | 45                    | 44,0  |
|                                    |                             | 90                    | 65,0  |
|                                    |                             | 120                   | 82,1  |
| Твин-80, 0,2 % раствор в 0,2 М HCl | 900                         | 45                    | 54,1  |
|                                    |                             | 90                    | 74,7  |
|                                    |                             | 120                   | 87,0  |

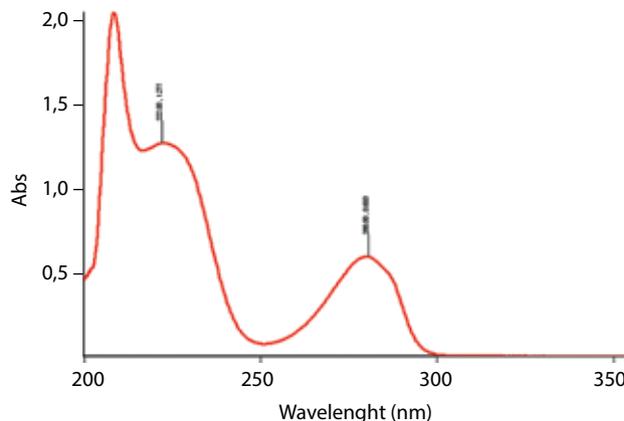
**Примечание.** Результаты получены для серии 1 при температуре 37 °С и скорости вращения лопастной мешалки 100 об/мин.

Учитывая результаты эксперимента и рекомендации ГФ XIV [7] для проведения испытания «Растворение» для капсул СЕКО выбраны следующие оптимальные условия:

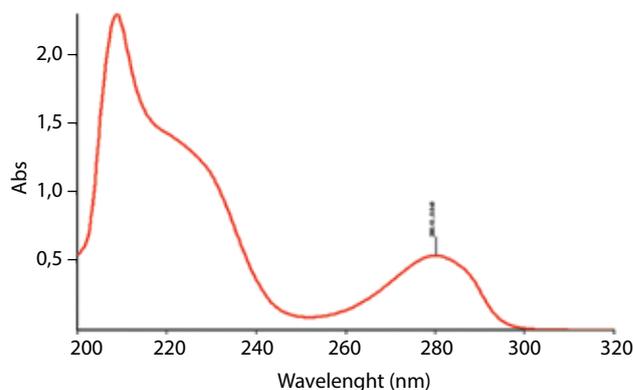
- среда растворения – 0,2 % раствор Твина-80 в 0,1 М хлористоводородной кислоте;
- объем среды растворения – 900 мл;
- температура проведения теста – 37 °С;
- скорость вращения лопастной мешалки – 100 об/мин;
- время проведения теста – 2 ч.

Для определения степени высвобождения СЕКО из капсул использовали метод прямой спектрофотометрии, который считается методом выбора количественной оценки в тесте «Растворение» и отличается высокой достоверностью, воспроизводимостью, точностью и простотой исполнения [4, 19, 22].

Предварительно нами было изучено поглощение растворов вспомогательных веществ и стандартного образца (СО) СЕКО в 0,2 % растворе Твина-80 в 0,1 М хлористоводородной кислоте (рис. 1, 2). СЕКО имеет максимум поглощения при длине волны (280 ± 2) нм, при этом вспомогательные вещества, входящие в состав препарата, не поглощают электромагнитное излучение на указанной длине волны и не мешают определению.



**Рис. 1.** Электронный спектр поглощения раствора СЕКО (СО) в среде растворения 0,1 М HCl + 0,2 % Твин-80

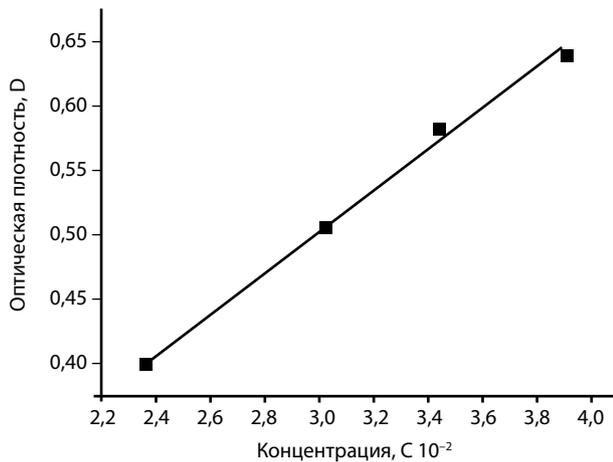


**Рис. 2.** Электронный спектр поглощения раствора ЛФ СЕКО в среде растворения 0,1 М HCl + 0,2 % Твин-80

Мы исследовали также зависимость оптической плотности от концентрации растворов СЕКО в 0,2 % растворе Твина-80 в 0,1 М хлористоводородной кислоте в максимуме поглощения. Линейная зависимость оптической плотности растворов от концентрации СЕКО была подтверждена в пределах интервала от  $2,4 \times 10^{-2}$  до  $4,0 \times 10^{-2}$  мг/мл (рис. 3). Коэффициент корреляции составлял 0,9999.

При проведении испытания капсулу препарата помещали в стакан тестера, содержащий 900 мл среды растворения. Через заданное время отбирали пробу раствора объемом 50 мл, которую фильтровали через фильтр «Миллипор». В колбу вместимостью 25 мл помещали 12,5 мл фильтрата и доводили средой растворения до метки. В качестве раствора СО использовали раствор, содержащий 4 мг СЕКО в 100 мл среды растворения. Измерение оптической плотности испытуемого раствора и раствора СО проводили относительно среды растворения в максимуме при длине волны 280 нм. Далее рассчитывали количество СЕКО, перешедшее в раствор, в процентах.

С помощью разработанной методики по показателю «Растворение» проведен анализ 3 серий



**Рис. 3.** Зависимость оптической плотности стандартных растворов ЛФ СЕКО в среде растворения 0,1 М НСl + 0,2 % Твин-80 от концентрации

ЛФ «Секоизоларицирезинол, капсулы 100 мг». Все изученные серии в выбранных условиях удовлетворяли требованиям ГФ XIV: в среднем не менее 75 % действующего вещества, содержащегося в ЛФ, перешло в среду растворения (табл. 4). Следует отметить, однако, что результаты для серии 3 отличаются от результатов серий 1 и 2 и близки к 100 %. Возможно, это связано с тем, что гранулят при производстве этой серии был лучше высушен (потеря в массе при высушивании содержимого капсулы составила 0,5 % в отличие от серий 1 и 2, где значение этого показателя составило 5,8 и 5,6 % соответственно).

### Заключение

В результате проведенных исследований выбраны оптимальные условия, в которых в среду растворения из капсул, содержащих 100 мг СЕКО, высвобождается более 75 % активного вещества. Для количественной оценки высвобождения СЕКО из капсул разработана аналитическая методика, позволяющая с высокой достоверностью и точностью

**Таблица 4.** Результаты испытания «Растворение» для ЛФ «Секоизоларицирезинол, капсулы 100 мг»

| Серия | Среднее содержание СЕКО в капсуле, мг | Количество СЕКО, перешедшее в раствор |       |
|-------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------|
|       |                                       | мг                                    | %     |
| 1     | 102,5                                 | 77,1                                  | 75,3  |
|       |                                       | 86,2                                  | 84,1  |
|       |                                       | 82,0                                  | 80,0  |
|       |                                       | 72,8                                  | 71,0  |
|       |                                       | 79,6                                  | 77,7  |
|       |                                       | Ср. = 77,6                            |       |
| 2     | 96,6                                  | 70,8                                  | 73,3  |
|       |                                       | 75,6                                  | 78,3  |
|       |                                       | 68,4                                  | 70,8  |
|       |                                       | 73,5                                  | 76,1  |
|       |                                       | 77,1                                  | 79,8  |
|       |                                       | Ср. = 75,7                            |       |
| 3     | 98,6                                  | 99,6                                  | 101,0 |
|       |                                       | 97,8                                  | 99,2  |
|       |                                       | 91,2                                  | 92,5  |
|       |                                       | 94,9                                  | 96,3  |
|       |                                       | 96,4                                  | 97,8  |
|       |                                       | Ср. = 97,4                            |       |

*Примечание.* Результаты получены при температуре 37 °С и скорости вращения лопастной мешалки 100 об/мин.

контролировать содержание активного вещества в среде растворения. На основании полученных экспериментальных данных разработана методика проведения испытания «Растворение» для ЛФ «Секоизоларицирезинол, капсулы 100 мг».

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- FIP Guidelines for Dissolution Testing of Solid Oral Products. Dissolution Technol 1997;4:5–14.
- Guidance for Industry. Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls, In Vitro Dissolution Testing, and In Vivo Bioequivalence Documentation. September 1997.
- Guidance on the Investigation of Bioequivalence. European Medicines Agency (EMA). Committee for Medicinal Products of Human Use (CHMP), 2010.
- Смехова И.Е., Перова Ю.М., Кондратьева И.А. и др. Тест «Растворение» и современные подходы к оценке эквивалентности лекарственных препаратов (обзор). Разработка и регистрация лекарственных средств 2013;1(2):50–61. [Smekhova I.E., Perova Yu.M., Kondratieva I.A. et al. Dissolution test and modern approaches to assessment of equivalence of medicines (review). Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Development and Registration of Medicines 2013;1(2):50–61. (In Russ.)].
- USP 33 – NF 28 Monograph 1092 “Dissolution Procedure: Development and Validation”.
- Recommendations on dissolution testing. PHARMEUROPA 2008;20(3):525–7.
- ОФС 1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм». Государственная Фармакопея Российской Федерации,

- XIV изд. Т. 2. 2018. [Monograph 1.4.2.0014.15 "Dissolution for the solid dosed dosage forms". St. Ph. XIV edn. Vol. 2. 2018. (In Russ.).]
8. ICH Q8 9R2. Pharmaceutical Development EMEA/CHMP/167068/2004-ICH.
  9. Amidon G.L., Lennerns H., Shah V.P., Crison J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutics drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm Res* 1995;12(3):413–20. PMID: 7617530.
  10. Reddy B.V.K., Karunakar A. Biopharmaceutics classification system: a regulatory approach. *Dissolution Technol* 2011;February:31–3.
  11. Saarinen N.M., Huovinen R., Wäri A. et al. Enterolactone inhibits the growth of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinomas in the rat. *Mol Cancer Ther* 2002;1(10):869–76. PMID: 12492120.
  12. Niemeyer H.B., Honig D.M., Kulling S.E., Metzler M. Studies of the metabolism of the plant lignans secoisolariciresinol and matairesinol. *J Agric Food Chem* 2003;51(21):6317–25. DOI: 10.1021/jf030263n. PMID: 14518962.
  13. Нифантьев Н.Э., Яшунский Д.В., Меньшов В.М. и др. Способ выделения секоизоларицирезинола и дигидрокверцетина из древесины. Патент на изобретение РФ, 2009, № 2359666. [Nifantsev N.E., Yashunsky D.V., Menshov V.M. et al. Way of allocation of a secoisolariciresinol and dihydroquercetin from wood. The Patent for the invention of the Russian Federation, 2009, No. 2359666. (In Russ.).]
  14. Орлова О.Л., Полозкова А.П., Трещалина Е.М. и др. Средство для лечения эстрогензависимых опухолей. Патент на изобретение РФ, 2012, № 2510268. [Orlova O.L., Polozkova A.P., Treshchalina E.M. et al. Means for treatment of estrogen-dependent tumors. Patent for the invention of the Russian Federation, 2012, No. 2510268. (In Russ.).]
  15. Борисова Ю.А., Шпрах З.С., Смирнова Г.Б. и др. Разработка пероральной лекарственной формы секоизоларицирезинола под контролем эффективности. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 2014;25(3–4):51–4. [Borisova Yu.A., Shprakh Z.S., Smirnova G.B. et al. Development of an oral dosage form of a secoisolariciresinol under control of efficiency. *Vestnik RONC im. N.N. Blokhina RAMN = Bulletin of N.N. Blokhin RCRC of the RAMS* 2014;25(3–4):51–4. (In Russ.).]
  16. Борисова Ю.А., Смирнова Г.Б., Райхлин Н.Т. и др. Результаты скрининга фитоантиэстрогена секоизоларицирезинола на эстрогензависимой аденокарциноме молочной железы Ca755. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 2014;25(1–2):26–30. [Borisova Yu.A., Smirnova G.B., Raykhlin N.T. et al. Results of screening of phytoantiestrogen secoisolariciresinol on an estrogen-dependent mammary adenocarcinoma Ca755. *Vestnik RONC im. N.N. Blokhina RAMN = Bulletin of N.N. Blokhin RCRC of the RAMS* 2014;25(1–2):26–30. (In Russ.).]
  17. Борисова Ю.А., Смирнова Г.Б., Калишьян М.С. и др. Результаты доклинического изучения нового фитоантиэстрогена секоизоларицирезинола на опухолевых моделях *in vivo*. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 2014;25(3–4):43–50. [Borisova Yu.A., Smirnova G.B., Kalishyan M.S. et al. Results of preclinical studying of new phytoantiestrogen secoisolariciresinol on the tumor models *in vivo*. *Vestnik RONC im. N.N. Blokhina RAMN = Bulletin of N.N. Blokhin RCRC of the RAMS* 2014;25(3–4):43–50. (In Russ.).]
  18. Борисова Ю.А., Смирнова Г.Б., Андронина Н.В. Результаты доклинического изучения секоизоларицирезинола на подкожных ксенографтах рака молочной железы человека. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина 2015;26(доп.):47–51. [Borisova Yu.A., Smirnova G.B., Andronina N.V. Results of preclinical studying of a secoisolariciresinol on subcutaneous xenografts of human breast cancer. *Vestnik RONC im. N.N. Blokhina = Bulletin of N.N. Blokhin RCRC* 2015;26(suppl.):47–51. (In Russ.).]
  19. Игнатъева Е.В., Дмитричева Н.Д., Ярцева И.В., Шпрах З.С. Количественное определение секоизоларицирезинола в лекарственной форме. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(1):140. [Ignatyeva E.V., Dmitricheva N.D., Yartseva I.V., Shprakh Z.S. Quantitative definition of a secoisolariciresinol in a dosage form. *Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2014;13(1):140. (In Russ.).]
  20. Раменская Г.В., Шохин И.Е., Савченко А.Ю., Волкова Е.А. Испытание «Растворение» в средах, моделирующих физиологические условия, как способ оценки поведения лекарственных средств *in vivo*. Биомедицинская химия 2011;57(5):482–9. [Ramenskaya G.V., Shokhin I.E., Savchenko A.Yu., Volkova E.A. Dissolution test in biorelevant media as a prognostic tool for modeling of drug behavior *in vivo*. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry* 2011;57(5):482–9. (In Russ.).]
  21. Дубовик Н.С. Разработка методики испытания «Растворение». В сб.: Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли. М.: Фармконтракт, 2015. С. 41–56. [Dubovik N.S. Development of techniques of test "Dissolution". In: The "Dissolution" test in development and registration of medicines. Scientific practical guidance for the pharmaceutical industry. Moscow: Pharmcontract, 2015. Pp. 41–56. (In Russ.).]
  22. Шпрах З.С., Игнатъева Е.В., Ярцева И.В. и др. Разработка и валидация методики количественного определения цифетрилина в таблетках. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(3):55–62. [Shprakh Z.S., Ignatyeva E.V., Yartseva I.V. et al. Development and validation of Cyphetrylin assay in tablets. *Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2016;15(3):55–62. (In Russ.).]

#### ORCID авторов/ORCID of authors

З.С. Шпрах/Z.S. Shprakh: <https://orcid.org/0000-0003-3034-750X>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.



