

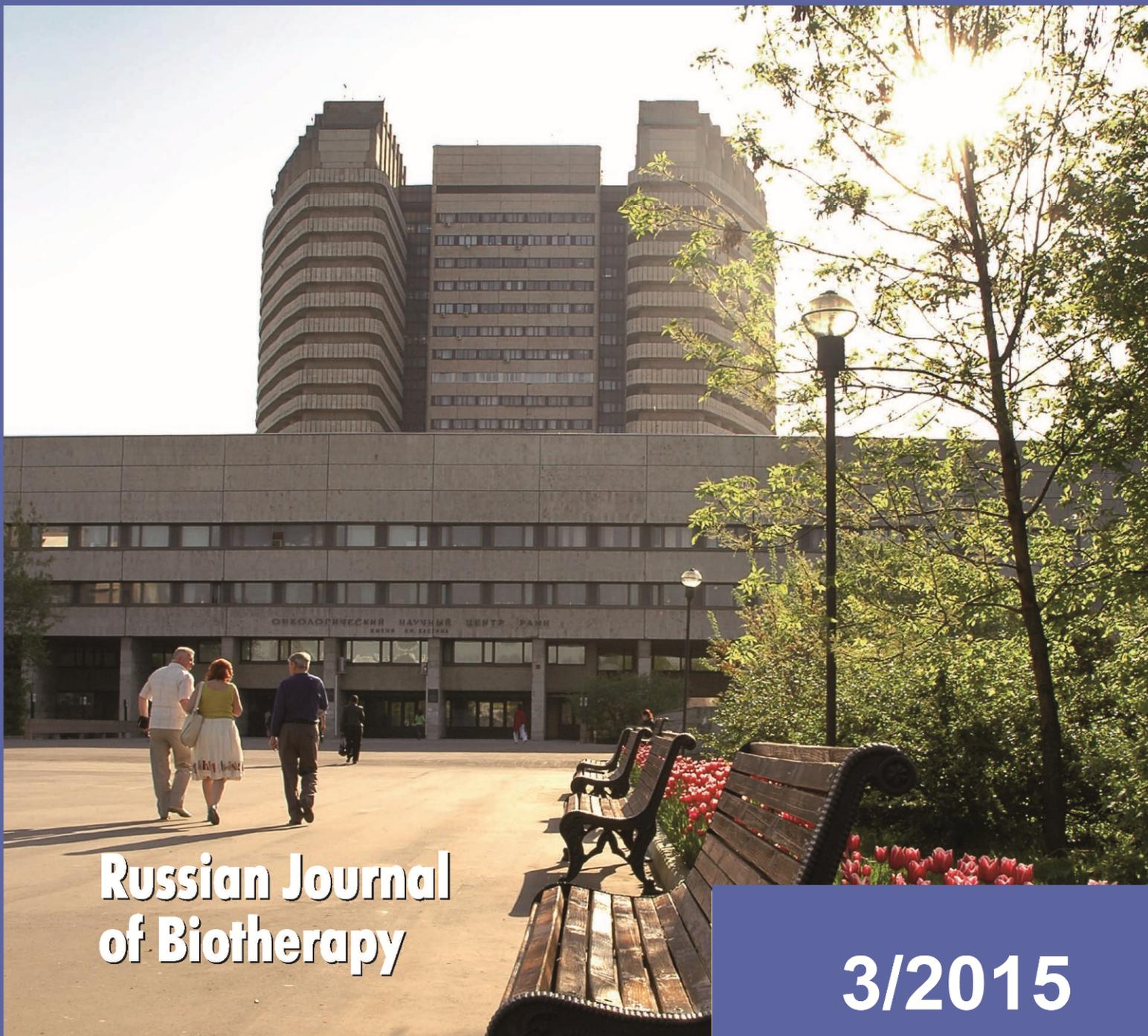


ISSN 1726-9784



# Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



Russian Journal  
of Biotherapy

3/2015

ISSN 1726-9784

# РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№3 Том 14 2015 г.

УДК 616-085.2/3

## Учредители

ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»; НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей

## Главный редактор

А.Ю. Барышников, д-р мед. наук, проф.

## Заместители главного редактора

А.В. Караулов, чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, проф.; Н.А. Оборотова, д-р фарм. наук, проф.

## Редколлегия

И.А. Балдуева, д-р мед. наук (Санкт-Петербург),  
М.А. Барышникова, канд. фарм. наук, отв. секретарь (Москва),  
О.А. Бочарова, д-р биол. наук, проф. (Москва),  
А.К. Голенков, д-р мед. наук, проф. (Москва), М.И. Давыдов, д-р мед. наук, проф., академик РАН (Москва),  
Л.В. Демидов, д-р мед. наук, проф. (Москва),  
И.В. Евсегнеева, д-р мед. наук, проф. (Москва), П.К. Иванов, д-р мед. наук (Москва),  
З.Г. Кадагидзе, д-р мед. наук, проф. (Москва), И.Ю. Кубасова, канд. мед. наук (Москва),  
В.В. Новиков, д-р биол. наук, проф. (Нижний Новгород), В.В. Решетникова, канд. тех. наук (Москва),  
Н.С. Сергеева, д-р мед. наук, проф. (Москва), Е.В. Степанова, д-р мед. наук (Москва),  
Н.Н. Тупицын, д-р мед. наук, проф. (Москва), Е.Г. Турнянская, канд. мед. наук (Москва),  
Ю.В. Шишкин, д-р мед. наук, проф. (Москва), З.С. Шпрах, канд. фарм. наук (Москва),  
И.Ж. Шубина, д-р биол. наук (Москва), Р.И. Якубовская, д-р мед. наук, проф. (Москва)

«Российский биотерапевтический журнал» является рецензируемым изданием

Зарегистрировано в Федеральной службе по надзору в сфере связи,  
информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Регистрационный номер:

ПИ №77-11695 от 21.01.2002 г.; ПИ № ФС77-53039 от 04.03.2013 г.

## Почтовый адрес:

115478 Москва, Каширское ш., 24

ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»

НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей

Тел.: +7 (499) 323 57 00, +7 (499) 324 10 65; факс: +7 (499) 324 22 74;

E-mail: [biotherapy\\_rbi@mail.ru](mailto:biotherapy_rbi@mail.ru)

Интернет-версия: <http://www.ronc.ru/main/zhurnaly/rossijskij-bioterapevticheskij-zhurnal.html>

## Подписной индекс 81679

Объем 4 усл.-печ. листов,

подписано в печать 16.10.2015

Тираж 1000 экз.

Издательская группа РОНЦ:

115478 Москва, Каширское шоссе, д. 24.

Тел. +7 (499) 324 24 70; [ronc@list.ru](mailto:ronc@list.ru)

Координаторы: Е.Г. Турнянская, Б.Б. Крюков (макет)

Принт-менеджмент:

Печатный центр "Удача"

115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23

# СОДЕРЖАНИЕ №3 2015

## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

*Т.В. Осипова, В.М. Бухман*

**БИОМАРКЕРЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ НЕФРОТОКСИЧНОСТИ**..... 3

*И.Ж. Шубина, А.В. Сергеев, Л.Т. Мамедова, Н.Ю. Соколов<sup>1</sup>, М.В. Киселевский*

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПРОТИВООПУХОЛЕВОМ ИММУНИТЕТЕ** ..... 19

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*Ю.П. Финашутина, А.В. Мисюрин<sup>2</sup>, Т.В. Ахлынина, Н.А. Лыжко,*

*А.А. Крутов, Е.В. Аксенова, В.А. Мисюрин, А.Ю. Барышников*

**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНОГО БЕЛКА PRAME И МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К НЕМУ** ..... 29

*О.С. Бурова, Н.В. Голубцова, А.Е. Бармаилов, М.В. Оборотова, Л.Ф. Морозова, К.А. Барышников,*

*В.И. Карасева, М.А. Барышникова, А.Н. Иншаков, А.С. Гриневиц, И.М. Лученко, П.К. Иванов, А.Ю. Барышников*

**МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ISO-401 ПРОТИВ АНТИГЕНА CD133** ..... 37

*М.П. Киселева, З.С. Шпрах, Л.М. Борисова, И.Ю. Кубасова, Л.Г. Деженкова, Д.Н. Калюжный,*

*А.В. Ланцова, Е.В. Санарова, А.А. Штиль, Н.А. Оборотова, З.С. Смирнова, А.Ю. Барышников*

**ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНОГО N-ГЛИКОЗИДА ИНДОЛКАРБАЗОЛА ЛХС-1208. СООБЩЕНИЕ II**..... 41

*Н.Ю. Кульбачевская, Е.В. Санарова, О.И. Коняева, Н.П. Ермакова,*

*В.М. Бухман, А.В. Ланцова, А.П. Полозкова, О.Л. Орлова, Н.А. Оборотова*

**ИЗУЧЕНИЕ «ОСТРОЙ» ТОКСИЧНОСТИ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ТИОСЕНСА** ..... 49

*М.А. Каплан, А.И. Малыгина, Г.В. Пономарев, А.А. Михайловская, В.В. Дрожжина,*

*Л.М. Архипова, Ю.С. Осипчук*

**ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОР ЛИПОСОМАЛЬНЫЙ АМИДОАМИНХЛОРИН ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ САРКОМЫ M-1 КРЫС** ..... 55

*Н.Д. Олтаржевская, М.А. Коровина, Ю.А. Барсуков, А.Г. Малихов, Д.В. Кузмичев, И.Ш. Татаев*

**СОЗДАНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛЕЧЕБНЫХ ГЕЛЕЙ «КОЛЕГЕЛЬ» ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЯМОЙ КИШКИ** ..... 63

*А.Н. Романов, А.О. Ковригин, А.Ф. Лазарев, В.А. Лубенников, Д.А. Романов*

**ГИСТЕРЕЗИС ЗАВИСИМОСТЕЙ ДИЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КРОВИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ**..... 69

Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» ..... 48; 62; 75

## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 615.277.3:616.61-099:57.088

Т.В. Осипова, В.М. Бухман

## БИОМАРКЕРЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ НЕФРОТОКСИЧНОСТИ

ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, Москва

## Контактная информация

Осипова Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО

адрес: 115478 Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(499)324-10-65

e-mail: [tvosipova2011@yandex.ru](mailto:tvosipova2011@yandex.ru)

Статья поступила 05.06.2015, принята к печати 10.08.2015.

## Резюме

Применение противоопухолевых препаратов, особенно на основе платины, связано с токсическим поражением различных здоровых тканей и органов, включая почки. Среди них цисплатин занимает одно из ведущих мест и обладает наибольшей нефротоксичностью, которую в течение многих лет оценивали по уровню сывороточного креатинина и азота мочевины крови. Однако эти маркеры обладают рядом существенных недостатков и не обеспечивают раннего обнаружения ОПП. Для идентификации ранних этапов ОПП нужны новые, более информативные маркеры, которые свидетельствовали бы о появлении начальных признаков поражения очень рано и независимо от фильтрационной функции почек. В обзоре представлены характеристики современных, перспективных маркеров раннего повреждения почек. Особое внимание уделено панели маркеров, рекомендуемых для доклинического изучения потенциальной нефротоксичности лекарств-кандидатов для передачи на клинические испытания. Приведены данные исследований о роли биомаркеров в ранней диагностике ОПП, вызванных цисплатином и его аналогами. Использование ROC-анализа в этих исследованиях показало, что новые маркеры обладают большей чувствительностью и специфичностью, чем традиционный креатинин и азот мочевины крови и могут быть использованы для диагностики и мониторинга почечных поражений, вызванных лекарственными препаратами.

**Ключевые слова:** нефротоксичность, цисплатин, биомаркеры, диагностика.

Т.В. Osipova, V.M. Bukhman

## BIOMARKERS OF DRUG NEPHROTOXICITY

FSBI «N.N. Blokhin RCRC», Moscow

## Abstract

Antineoplastic drugs, especially those on the basis of platinum, used for chemotherapy of cancer can also affect various normal tissues and organs including kidneys. *Cisplatin* occupies one of the leading places and possesses the greatest nephrotoxicity. For many years nephrotoxicity has been evaluated at the level of serum creatinine and of blood urea nitrogen. However these markers have a number of essential shortcomings and do not provide early detection of AKI. To identify early AKI stages new more informative markers are needed, which could make evidence of emerging initial signs of disorders at the earliest and irrespective of filtrational function of kidneys. Characteristics of modern perspective markers of early disorders of kidneys are presented in the review. Special attention is paid to the panel of markers of potential nephrotoxicity of drugs – candidates for clinical trials, which are recommended for preclinical study. The review presents data of investigations of the role of biomarkers in early diagnostics of AKI caused by *cisplatin* and its analogues. Use of the ROC analysis in these studies showed that new markers are more sensitive and specific than serum creatinine and blood urea nitrogen and can be used for diagnostics and monitoring of kidney disorders caused by chemotherapeutic drugs.

**Key words:** nephrotoxicity, *cisplatin*, biomarkers, diagnostics.

## Введение

Нефротоксичность может развиваться при действии различных лекарств. Это осложнение свойственно, в частности, цисплатину и, в меньшей

степени, другим платиновым металлокомплексам, аминогликозидным антибиотикам, НСПВС. Лекарственная нефротоксичность оценочно наблюдается в 19–25 % случаев острого поражения почек у тяжелых больных.

Процесс разработки новых лекарств является громоздким и высоко затратным. Подсчитано, что 99 % кандидатов в новые лекарства бракуется в процессе разработки. Причём 30 % таких кандидатов бракуется во время проведения клинических исследований из-за непредвиденных профилей токсичности и побочных эффектов, включая поражение почек [81].

Задача доклинических исследований – не допустить новые нефротоксичные препараты в клинику или, в случае их высокой специфической эффективности, как можно полнее охарактеризовать этот вид токсичности, чтобы максимально обеспечить корректирующие мероприятия при клиническом использовании (уже начиная с первой фазы клинических испытаний; [11]). Для этого важно знать не только механизмы возникновения и развития нефротоксичности, но и на какие отделы нефрона направлено поражающее действие [17].

Среди противоопухолевых препаратов нефротоксичность особенно выражена у цисплатина, который широко используются в лечении большого количества злокачественных опухолей [3]. Применение цисплатина часто сопровождается поражением различных нормальных органов и тканей, включая почки. Тяжелое течение осложняется и высокая смертность пациентов в результате развития острого поражения почек, которое, в связи с прогрессом в лечении, может принять хроническое течение (хроническое повреждение почек, ХПП), значительно ограничивает его использование в клинике [6;19]). Хотя клеточные и молекулярные механизмы нефротоксичности соединений платины до конца не изучены, в основе их лежит гибель эпителиальных клеток различных отделов почечных канальцев [50]. Высокая чувствительность почек к цисплатину и, в меньшей степени, к другим препаратам платины [1; 5] объясняется тем фактом, что почки являются основным органом выделения платины. Почки накапливают платину в большей степени, чем другие органы. Прежде всего, поражается эпителий проксимальных канальцев, что может вторично приводить к гибели клеток в различных отделах почечных канальцев [47].

#### Биомаркеры нефротоксичности

*Сывороточный креатинин (СКр, Serum creatinine, SCr)*, описан еще в 1904 г. СКр, имеющий молекулярный вес 113 а.е.м., синтезируется из фосфокреатинина, который, в свою очередь, является продуктом метаболизма креатина после его высвобождения из мышцы. СКр свободно фильтруется клубочком и затем экскретируется без значительного метаболизма или реабсорбции почкой. Эти свойства сделали СКр полезным суррогатным маркером для оценки функции почки, а реципрокная взаимосвязь между СКр и скоростью клубочковой фильтрации (СКФ) хорошо известна и неоднократно рассмотрена [58].

*Мочевина (Urea-N), Азот мочевины крови (АМК, Blood urea nitrogen, BUN)* – конечный продукт белкового катаболизма, описанный в 1952 г.

Она свободно фильтруется клубочком, пассивно реабсорбируется в проксимальных и дистальных канальцах нефрона и экскретируется в мочу в высокой концентрации. Мочевину синтезирует, прежде всего, печень в связи с поступлением белка с приёмом пищи, что является определяющим фактором ее продукции.

СКр и АМК считаются, до настоящего времени, «золотым стандартом» при использовании минимально инвазивного клинико-химического анализа. В связи с высокой способностью почек компенсировать потерю своей ткани и восстанавливаться после острого почечного инсульта чувствительность СКр и АМК очень слабая. Было продемонстрировано, что ослабление функциональной активности почек происходит только после потери двух третей почечной биомассы [30]. На параметры уровней этих двух биомаркеров влияют многие факторы. Уровень СКр, являющегося продуктом распада мышечной ткани, зависит от возраста, пола, мышечной массы и веса тела. Показано, что желудочно-кишечное кровотечение ведёт к увеличению уровня СКр при отсутствии какого-либо отрицательного влияния на почки. Уровень АМК также возрастает в сыворотке при патологических процессах типа усиленного катаболизма белков. Непочечные причины изменения уровня АМК – *застойная сердечная недостаточность, кардиальный приступ, чрезмерный уровень белка в ЖКТ, желудочно-кишечное кровотечение, гиповолемия, шок, обезвоживание*. Непочечные причины изменения уровня СКр – *застойная сердечная недостаточность, шок, обезвоживание, эклампсия, преэклампсия, рабдомиолиз (острый некроз скелетных мышц; [30])*.

Но этим традиционным маркерам присущи недостатки, ограничивающие ценность их использования. Это, во-первых, отсутствие региональной специфичности и, во-вторых, достоверные изменения уровней наступают только после поражения 30–50 % клеток (определяется с помощью гистопатологического исследования или функциональных тестов [15]) и *варьируют в зависимости от мышечной массы, возраста, пола, медикации и состояния гидратации [52]*. Считается, что традиционные сывороточные маркеры сохраняют важность для оценки функционирования почек у больных со стабильной хронической болезнью почек, но плохи в случае острого заболевания [15]. СКр и АМК являются функциональными маркерами почек, но не маркерами поражения почечных структур [14; 58; 52]. Поэтому продолжается поиск новых более эффективных биомаркеров, прежде всего – для ранней диагностики ОПП. Они необходимы для эффективного изучения нефротоксичности как на лабораторных животных, так и в клинике.

Свойства идеального биомаркера [52]:

1. он должен нарабатываться повреждёнными клетками и проявлять органоспецифичность;
2. его концентрация в организме должна быть пропорциональна выраженности поражения;

- он должен экспрессироваться вскоре после повреждения органа, пока это повреждение ещё потенциально обратимо;
- его концентрация должна быстро падать после эпизода острого поражения, чтобы его можно было использовать в качестве инструмента терапевтического мониторинга;
- его измерение должно быть быстрым и надёжным.

В настоящее время известно, что первые признаки развития ОПП появляются очень рано. Поэтому актуальным является поиск новых, более информативных маркеров, которые бы свидетельствовали даже о небольших, носящих обратимый характер поражениях рано и независимо от фильтрационной функции почек [20]. Возникновение и развитие ОПП является сложным и многогранным процессом. Разные этапы его, независимо от того, чем он вызван, могут сопровождаться возникновением и накоплением в моче и в сыворотке различных биологических веществ, потенциальных маркеров происходящих процессов. Биомаркеры в моче могут появляться в результате усиления белкового синтеза в эпителиальных клетках различных отделов нефрона, нарушения процессов реабсорбции в проксимальных отделах почечных канальцев, а также в результате повреждения, гибели и восстановления эпителиальных клеток. Развитие воспалительных, аутоиммунных и иммунных процессов в свою очередь тоже может привести к появлению биомаркеров [52].

В последние годы благодаря развитию молекулярных методов анализа открыто большое количество биологических маркеров, позволяющих оценить функцию почек, возникающие поражения и предсказать их развитие. Большинство из этих маркеров можно разделить на две основные группы [79]. В первую входят маркеры, связанные со специфическим локусом поражения (клубочки, канальцы, собирательные трубки). Во вторую – маркеры, ассоциированные с механизмом поражения (воспаление, иммунная реакция, оксидативный стресс, фиброз и т.д.).

Основные характеристики биомаркеров ранней диагностики ОПП:

*Альбумин (Albumin)*. Один из основных белков крови (приблизительно половина белка сыворотки крови). Размер и отрицательный электрический заряд не позволяют ему экскретироваться через клубочки. Поэтому альбуминурия указывает на поражение клубочков. Увеличенная экспозиция клеток проксимальных канальцев крыс к альбумину может индуцировать апоптоз путём воздействия на пограничные жирные кислоты, уровень которых повышается под действием цисплатина, гентамицина, карбапенема А, тиацетамида, гексахлоробутиона и D-серинеина [30].

*Тотальный протеин (Total Protein)*. Тотальное количество протеина в моче, собранной у здоровых лиц, редуцировано до минимума. Большие сильно заряженные протеины клубочки не фильт-

руют. Небольшие белки, напротив, свободно проходят через клубочковый барьер и подвергаются реабсорбции проксимальными канальцами. Повышение содержания тотального количества протеина в моче указывает на поражение клубочков и/или проксимальных канальцев.

Оно происходит в результате действия цисплатина, гентамицина, ванкомицина, такролимуса, пурамицина и доксорубина [30].

*Молекула повреждения почек-1 (МПП-1, Kidney injury molecule-1, KIM-1)* – трансмембранный гликопротеин, кодируемый геном KIM1/TIM1/NAVCR, который не определяется в нормальной ткани почек. Однако его экспрессия резко возрастает и достигает высоких уровней в дедифференцированных эпителиальных клетках S<sub>3</sub> сегмента проксимальных канальцев почек человека и грызунов после ишемических и токсических поражений [7; 8; 33]. Зрелая форма МПП-1 находится на поверхности клеток и имеет молекулярную массу 104 кДа. Внеклеточный домен этого белка с молекулярной массой 90 кДа слущивается с поверхности клеток в просвет канальцев и является растворимой формой, определяемой в моче крыс, мышей и человека при развитии острого тубулярного некроза [7]. Основным преимуществом данного белка является стабильность в моче при комнатной температуре в течение длительного времени. Этот белок определяется в почках и в моче животных при использовании различных экспериментальных моделей нефротоксичности [40]. Несмотря на то, что участие и роль этого белка в процессах повреждения и восстановления почечной ткани окончательно не изучена, МПП-1 признан полезным маркером диагностики ранних поражений проксимальных отделов почечных канальцев [33]. Увеличение экспрессии МПП-1 в ткани почек и в моче наблюдается значительно раньше, чем проявляются функциональные нарушения почек, определяемые измерением уровней СКр и АМК. МПП-1 – первый маркер, рекомендованный регуляторными властями США, Европы и Японии для доклинической оценки потенциальной нефротоксичности кандидатов в новые лекарства.

*Ассоциированный с нейтрофильной желатинозой липокалин или липокалин 2 (АНЖЛ, Neutrophile gelatinase-associated lipocalin, NGAL)* – низкомолекулярный гликопротеин с молекулярной массой 25 кДа, принадлежит к семейству липокалинов. АНЖЛ экспрессируется на очень низком уровне клетками тканей многих органов, в том числе почек, желудочно-кишечного тракта, легких. Экспрессия АНЖЛ значительно усиливается в стимулированном к пролиферации эпителии. В нормальной ткани почек белок определяется в клетках дистальных канальцев и собирательных трубок нефрона и его уровень в моче очень низкий [55; 56]. Показано, что в норме АНЖЛ участвует в процессах дифференцировки и структурной реорганизации почечных эпителиальных клеток. В случае развития ОПП эпителиальные клетки проксимальных канальцев начинают усиленно синтезировать этот белок.

Наблюдается многократное увеличение синтеза мРНК ренального АНЖЛ в клетках восходящей петли Генле и в собирательных трубочках [57]. При повреждении клеток проксимальных канальцев уровень АНЖЛ в сыворотке возрастает в 7–16 раз, а в моче в 25–1000 раз [54]. Впервые этот белок был обнаружен у мышей с ОПП, вызванным ишемией. В этих исследованиях, используя ДНК-микрочипы, наблюдали в течение первых нескольких часов после ишемического поражения многократное увеличение экспрессии 7 генов, одним из которых был АНЖЛ. В экспериментах на животных было показано, что АНЖЛ относится к числу самых ранних белков, индуцируемых в почках после ишемии и действия токсических препаратов. Резкое увеличение уровня этого белка в почках, моче и плазме в ответ на повреждение наблюдали, как у человека, так и у животных [77]. Нарастание уровня АНЖЛ происходит на 1–2 дня раньше, чем увеличение СКр и отражает степень тяжести поражения почек [38].

*Результаты многочисленных исследований показали, что АНЖЛ является эффективным ранним маркером и предиктором большого числа почечных патологий, в том числе и ОПП, связанных с нефротоксичностью фармпрепаратов [2].*

*Цистатин С* – низкомолекулярный негликозилированный белок с молекулярной массой 13 кДа, являющийся ингибитором протеаз. Синтезируется всеми ядерными клетками организма. В норме цистатин С легко фильтруется клубочками, полностью реабсорбируется и катаболизируется клетками проксимальных канальцев. При отсутствии патологии в моче регистрируется минимальная концентрация этого белка.

Однако при нарушении процесса реабсорбции в проксимальных отделах почечных канальцев его уровень в моче может возрастать до двухсот раз. Соотношение уринального цистатина С к СКр является хорошим индикатором дисфункции почечных канальцев. Вследствие этого уренальный цистатин С рассматривается, как один из важных маркеров ОПП [52; 84]. Измерение скорости клиренса цистатина С из крови в мочу, в ряде случаев (уменьшение мышечной массы, дети и старики), адекватнее оценки скорости клиренса СКр [30].

*Белок, связывающий жирные кислоты L-mitina (БСЖК-L, L-type fatty acid binding protein, L-FABP).* В почках человека имеется два типа БСЖК: L-тип (печеночная форма) в проксимальных отделах канальцев и H-тип (сердечная форма) в дистальных отделах [51]. Это небольшие цитоплазматические белки, экспрессированные в тканях с активным метаболизмом жирных кислот. Они участвуют во внутриклеточном транспорте липидов в митохондрии или пероксисомы. Их точные биологические функции, механизмы действия и возможности использования как маркеров ранних поражений почек мало изучены [19]. L-БСЖК – белок с молекулярной массой 14 кДа, внутриклеточный липидный шаперон, образующийся в печени, кишечнике, поджелудочной железе, лёгких, нервной

системе, желудке и клетках проксимальных канальцев. Может быть определён в плазме и моче. Этот белок есть у человека, но отсутствует у мышей. В связи с этим изучение L-БСЖК проводят на трансгенных животных. Белок легко фильтруется через клубочки и реабсорбируется в проксимальных канальцах. Уровень L-БСЖК в моче увеличивается через 12 ч после поражения проксимальных канальцев почки [63].

*Интерлейкин 18 (ИЛ18, Interleukin 18, ИЛ-18)* – провоспалительный цитокин с молекулярной массой 18 кДа. Продуцируется макрофагами и эпителиальными клетками проксимальных канальцев после поражения. В экспериментах на животных было показано, что ИЛ–18 является важным медиатором в развитии ОПП разной этиологии [15; 19; 46; 64] и его уровень в моче рассматривается как потенциальный маркер ранней диагностики почечных поражений. ИЛ–18 начинает увеличиваться через 6 часов после поражения, к 12 часам его значения превышают нормальный уровень в 25 раз. Ряд исследователей указывают, что ИЛ–18 по своей чувствительности и специфичности схож с АНЖЛ, но уступает иным маркерам, таким как МПП-1 и цистатин С [15; 46; 64].

Такие *низкомолекулярные белки*, как  $\beta$ 2-микроглобулин,  $\alpha$ -1-микроглобулин, ретинол-связывающий белок (РСБ), молекулярная масса которых не превышает 40 кД, также рассматриваются как маркеры острого токсического поражения почек. Молекулярный вес этих белков меньше, чем у альбумина, что способствует их фильтрации в клубочках и почти полной реабсорбции клетками проксимальных канальцев, так что их экскреция в мочу минимальна или полностью отсутствует.

Так как поражение проксимальных канальцев может ослаблять способность почек эндоцитировать эти белки, их присутствие в моче в повышенном количестве может рассматриваться как проявление поражения почек [41].

*$\beta$ 2-микроглобулин* – белок с молекулярной массой 11,8 кДа является легкой цепью антигенов I класса главного комплекса гистосовместимости, экспрессированных на поверхности всех ядерных клеток. При развитии у пациентов аминогликозидной нефротоксичности увеличение экстракции этого белка в мочу происходит на 4–5 дней раньше повышения уровня СКр. Однако у значительной части пациентов изменения уровней были незначительны [41; 76]. Как маркер этот белок имеет существенные недостатки – нестабильность в моче, быстрая деградация при комнатной температуре и в моче с pH < 6,0 [41].

*Альфа-1-микроглобулин* – белок с молекулярной массой 31 кДа, синтезируемый печенью и легко связывающийся с сывороточным IgA. Только его свободная форма фильтрует клубочки и реабсорбируют проксимальные канальцы. Является чувствительным маркером дисфункции проксимальных канальцев [46]. Альфа-1-микроглобулин экскретировался в патологических количествах в мочу пациентов с миелопролиферативным синдро-

мом, у которых нефротоксичность осложнила лечение интерфероном альфа-2b. Его увеличение в моче наблюдалось на несколько дней раньше, чем СКр [45]. Заболевания печени и некоторые инфекции влияют на его продукцию, что является существенным недостатком этого маркера.

*Ретинол-связывающий белок (РСБ, Retinol binding protein, RBP)* – является низкомолекулярным липокалином с молекулярной массой 21 кДа, связанным с транспортом в ткани витамина А. РСБ легко фильтруется клубочками и почти полностью реабсорбируется в проксимальных канальцах. При поражении проксимальных канальцев РСБ не реабсорбируется и появляется в моче. Даже незначительное повреждение функции клеток проксимальных канальцев приводит к увеличению уровня этого белка в моче. В связи с этим РСБ рассматривается как ранний маркер повреждений проксимальных канальцев. РСБ в отличие от  $\beta$ 2-микроглобулина стабилен при низких значениях pH [46].

В течение многих лет для диагностики ранних стадий токсических поражений почек используются в качестве маркеров определяемые в моче ферменты [4; 5]: N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидаза (N-AG), гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспаргатаминотрансфераза (АСТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), глутаминсинтетаза (ГС), глутатион-S-трансферазы (Г-S-T- $\alpha$ , Г-S-T- $\mu$ , Г-S-T- $\pi$ ). Установлено, что локализация ферментов в различных отделах канальцев различна. Так в проксимальных отделах присутствуют N-AG, ГГТ, АЛТ, ЩФ, ГС и Г-S-T- $\alpha$ , а в дистальных – ЛДГ, АСТ и Г-S-T- $\mu$  (у крыс)/Г-S-T- $\pi$  (у человека) [92]. Гиперферментурия свидетельствует о разрушении эпителиальных клеток канальцев и выходе внутриклеточных ферментов в мочу, определение активности которых является ценным неинвазивным методом диагностики повреждения канальцевых структур почки [37; 91].

*N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидаза (N-AG, N-acethyl-beta-D-glucosaminidase, N-AG)* – лизосомальный фермент с молекулярной массой >130 кДа широко используется в диагностике ранних поражений почек. Фермент локализован в эпителиальных клетках преимущественно проксимальных канальцев и является самой активной глюкозидазой в лизосомах. Раннее повышение уровня N-AG в моче наблюдали при развитии дисфункции канальцев, в результате почечного заболевания или действия нефротоксикантов. Ложнопозитивный ответ бывает редко, активность сохраняется на протяжении всей активной фазы патологического процесса, но снижается до нормального уровня при восстановлении нормального функционирования почек или прекращении действия нефротоксиканта [70]. Источником N-AG в моче являются клетки проксимальных канальцев, так как из-за высокой молекулярной массы белок не фильтруется клубочками. Есть данные, что уровень N-AG в моче прямо коррелирует с тяжестью поражения канальцев [88]. Увеличение N-AG и его изомера В в моче является чувст-

вительным тестом поражения почечных канальцев. Было показано, что ценность N-AG как маркера, зависит от природы соединения, оказывающего нефротоксическое воздействие.

К факторам, ограничивающим его применение в диагностике почечных поражений, относятся угнетение эндогенной мочевиной, солями тяжелых металлов и увеличение уровня фермента при некоторых заболеваниях (ревматоидный артрит, гипертиреозидизм), происходящее при отсутствии ОПП, а также значительные внутри- и межвидовые вариации в моче [10; 88; 97].

*Гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТ, Gamma-glutamyl-transpeptidase, GGT) и щелочная фосфатаза (ЩФ, Alkyl Phosphatase, AP)* также являются ферментами, локализованными в мембране щеточной каемки эпителиальных клеток проксимальных канальцев и высвобождаемыми в мочу при ее разрушении.

Токсическое поражение (гистопатология и скорость клубочковой фильтрации) почек крыс комбинацией солевого истощения с введением индометацина и контрастной среды коррелировало с увеличением уровня в моче N-AG, но не ГГТ и ААП (аланинаминотранспептидазы) ([59]).

*Глутатион-S-трансфераза (Г-S-T, Glutathione -S-transferase, GST)* В 1998 г. ферменты семейства глутатион-S-трансфераз были предложены в качестве биомаркеров почечных поражений [42]. Г-S-T-зы являются семейством детоксицирующих ферментов, представленным в цитоплазме эпителиальных клеток канальцев почек. Щелочная Г-S-T, ранее известная как лигандин, присутствует в проксимальных извитых канальцах и в некоторых медуллярных канальцах почек кроликов и людей. Этот класс Г-S-T в норме не определяется в моче, но при различных повреждениях канальцев, в частности – цисплатином [29], легко высвобождается в мочу и используется, как маркер почечных нарушений. Кислая и нейтральная Г-S-T-зы присутствуют в дистальных извитых канальцах и в медуллярных канальцах, а микросомальная Г-S-T – в клубочковом и интерстициальном эндотелии и собирательных протоках, расположенных глубоко в мозговом слое [36]. Эти ферменты являются сайт-специфическими маркерами канальцевых повреждений. Существует несколько изомеров Г-S-T. Изомер Г-S-T- $\alpha$  локализован в эпителиальных клетках проксимальных канальцев как у человека, так и у крыс, а Г-S-T- $\mu$  (или Г-S-TY1b) – в дистальных отделах канальцев у крыс. У человека аналогом Г-S-T- $\mu$  является Г-S-T- $\pi$ . Г-S-T- $\alpha$  считается лучшим маркером раннего тубулярного некроза [35]. Одновременное определение концентраций Г-S-T- $\alpha$  и Г-S-T- $\mu$  (или Г-S-T- $\pi$ ) позволяет проводить дифференциальную диагностику нарушений проксимальных и дистальных отделов канальцев [36].

*Глутаминсинтетаза (ГС, Glutamine syntetase, GS)* – фермент, локализованный в митохондриях клеток тканей различных органов, включая почки. В наибольших количествах фермент содержится в клетках начального и конечного участков S<sub>3</sub> сег-

мента проксимальных канальцев. Повышение активности этого фермента в моче, свидетельствует о серьезных поражениях в S<sub>3</sub> сегменте [83].

*Кластерин (Clusterin)* – гетеродимерный белок с молекулярной массой 75–80 кДа, который экспрессирован в эпителии многих органов. В почках он сильно экспрессирован на ранних стадиях развития. Напротив, в здоровой зрелой почке не определяются ни сам белок, ни его мРНК. Но кластерин появляется в почках и в моче крыс, собак и человека в ответ на токсическое воздействие и при различных заболеваниях почек [35]. Кластерин (подобно МПП-1) экспрессируется на дедифференцированных клетках канальцев почек после развития ОПП различной этиологии [16]. Предполагают, что функции этого белка связаны с регуляцией апоптоза. Он обладает антиапоптотическими свойствами и способствует клеточной адгезии и агрегации [72]. Кластерин не фильтруется клубочками и в связи с этим повышение его в моче свидетельствует о повреждении клеток почечных канальцев. Показано, что уринальный кластерин является более информативным маркером поражения проксимальных канальцев, чем АМК и СКр, а тотальный белок, цистатин-С, β<sub>2</sub>-микроглобулин имеют преимущество перед АМК и СКр для установления повреждения клубочков [25]. На модели цисплатин-индуцированной нефротоксичности самцов крыс, продемонстрировано, что как тканевая МПП-1, так и уринальный кластерин можно рассматривать в качестве ранних маркеров острых поражений проксимальных канальцев. Поэтому они включены в панель маркеров, рекомендованных для доклинического изучения нефротоксичности лекарств [90].

*Трилистниковый фактор 3 (Тф3, Trefoil factor 3, Tff3)* – небольшой пептидный гормон, продуцируемый эпителиальными клетками. в почках – эпителиальными клетками собирательных трубок [13]. Одновременное измерение уровней Тф3и альбумина в моче способствовало выявлению ранних признаков поражения почечных канальцев [96].

*Ренальный папиллярный антиген-1 (РПА-1, Renal papillary antigen, RPA-1)* – гликопротеин с молекулярной массой 150–200 кДа, сильно экспрессированный в эпителиальных клетках собирательных трубок в папиллярной зоне почек. Высокие уровни этого белка определяются в моче у крыс под действием препаратов, вызывающих некроз клеток собирательных трубок. РПА-1 демонстрирует наибольшую по сравнению с другими маркерами специфичность в случае преимущественной локализации поражения в этом месте [27]. Изменения в уровне РПА-1 у крыс, получивших цисплатин, отражают вторичный минорный эффект повреждения проксимальных канальцев на дистальные сегменты нефрона [32; 35]. К сожалению, у человека эквивалента этому антигену пока не обнаружено.

*Нетрин-1 (Netrin 1)* – ламинин-подобный белок с молекулярной массой 50–75 кДа. Его биологические функции изучены мало. Предполагается, что он принимает участие в процессах неоваскуляризации, клеточной адгезии, роста нервных воло-

кон и опухолевого генеза. В норме экспрессия этого белка наблюдается во многих органах, в том числе – в почках.

Однако при поражениях почек, вызванных ишемией или нефротоксическими соединениями, уровень его экспрессии в тканях почек и содержание в моче значительно возрастают. В частности, уровень уринального нетрина 1 достигает пика уже через 6 ч после инъекции цисплатина мышам, а СКр достигает пика только через 72 ч. Уринальный уровень этого биомаркера увеличивается и при поражении почек у людей [71]. В настоящее время нетрин-1 рассматривается, как универсальный маркер для диагностики почечных нарушений при различных токсических воздействиях [41].

*Остеопонтин (Osteopontin, OPN)* – фосфорилированный гликопротеин, обильно представленный в костных тканях. Он ответственен за остеогенез и остеокластогенез, обнаруживаются на остеобластах и остеокластах, слабо экспрессирован в нормальных почечных канальцах, особенно в петле Генле, и может играть определённую роль в пролиферации почечных фибробластов и синтезе внеклеточного матрикса. Экспрессия его мРНК в почках крыс увеличивается под воздействием цисплатина в процессе индукции последним интерстициального фиброза почек. Почечный фиброз особенно часто проявляется при ХПН. Он развивается в результате прогрессирующих болезней, характеризующихся чрезмерным смещением внеклеточного матрикса, вырабатываемого, главным образом, миофибробластами. Инъекция цисплатина крысам может вызывать повреждение почечного эпителия и вслед за этим интерстициальный фиброз. Остеопонтин рассматривается в качестве фактора индукции макрофагов, которые играют существенную роль в развитии почечного фиброза, используется в качестве биомаркера повреждения почек; его экспрессия коррелирует с интенсивностью почечного повреждения [94; 95].

Все вышеперечисленные маркеры интенсивно изучались с целью установления их пригодности в диагностике ОПП различного происхождения, в том числе, вызываемых лекарственными препаратами. Разработка и внедрение адекватных биомаркеров нефротоксичности помогает правильно оценить токсичность в опытах на лабораторных животных, провести с наибольшей безопасностью клинические испытания новых кандидатов в лекарства (трансляционные исследования), своевременно диагностировать ОПП и ХПН, оценить динамику процесса и эффективность терапии. Новые биомаркеры нефротоксичности должны обладать достаточной чувствительностью и специфичностью, чтобы установить ранние признаки токсичности, локализацию и тяжесть поражения до того, как нарушения станут необратимыми.

Международный консорциум (The Predictive Safety Testing Consortium, PSTC), объединивший академических учёных, представителей крупных фармацевтических фирм, и администраторов регуляторных органов, рекомендовал в 2010 г. 7 лабо-

раторных тестов мочи крыс, которые сигнализируют о повреждении почек при доклиническом изучении нефротоксичности новых препаратов: МПП-1, альбумин, тотальный белок,  $\beta$ 2-микроглобулин, цистатин С, кластерин и Тф3. В 2014 г. рекомендовано ещё 2 биомаркера: ОПН и АНЖЛ. Эти биомаркеры в моче должны использоваться в дополнение к СКр и мочеvine/АМК [11; 18]. Уринарные маркеры в доклинических исследованиях должны использоваться вместе с традиционными сывороточными маркерами (СКр, АМК) и гистологическим исследованием.

Использование ROC-анализа показало, что новые маркеры обладают большей чувствительностью и специфичностью, чем СКр и АМК, и могут быть использованы для диагностики и мониторинга почечных поражений, вызванных лекарственными препаратами [11; 53].

Эта панель может быть расширена добавлением маркеров Г-S-T- $\alpha$ , Г-S-T- $\mu$  [72].

Биомаркеры ранней диагностики ОПН, вызванных препаратами платины

Развитие нефротоксичности после введения препаратов платины связано с целым каскадом процессов, включающим повреждение ДНК, оксидативный стресс, подавление белкового синтеза, нарушение функции митохондрий, апоптоз и некроз эпителиальных клеток канальцев. Токсический эффект препаратов платины зависит от используемого комплекса и связан с нарушением полярности эпителиальных клеток и механизмов базолатерального транспорта [12; 50]. К настоящему времени синтезированы тысячи производных, но используют в противоопухолевой терапии лишь несколько препаратов на основе платины, которые проявляют различную степень нефротоксичности. Эти отличия связаны с различными фармакокинетическими свойствами производных платины. Цисплатин широко применяют при лечении онкологических пациентов, что часто приводит к развитию нефротоксичности. Аналоги цисплатина (карбоплатин, недоплатин, оксалиплатин и др.), проявляя высокую противоопухолевую активность, сохраняют, хотя и в меньшей степени, чем цисплатин, нефротоксичность, так как содержат нефротоксичную платину [1; 5; 65]. Различные производные платины оказывают токсическое воздействие на разные отделы канальцевой системы почек. Карбоплатин и цисплатин, поражают, преимущественно, клетки проксимальных канальцев, а недоплатин – эпителиальные клетки ренальных сосочков и дистальных отделов канальцев [86].

Экскреция платины с мочой носит экстенсивный характер. В первые сутки после в/в инъекции цисплатина животным в мочу попадает 70–90 % от введённого количества. Первоначально платина распространяется практически по всем тканям, достигая наивысших уровней в почке, печени, яичнике, матке, коже и костях [48]. Почечный клиренс свободного цисплатина достоверно не отличается при различной скорости клубочковой фильтрации, а его экскреция почками представляет

собой комплексный процесс, который включает в себя клубочковую фильтрацию, секрецию и активную реабсорбцию через транспортную систему для органических кислот [62]. Цисплатин накапливается в клетках всех отделов канальцев нефрона, но преимущественно в S<sub>3</sub> сегменте проксимальных канальцев. Поэтому эти участки наиболее сильно подвержены поражениям. ОПН может индуцировать даже одна доза цисплатина [22]. Нефротоксичность цисплатина является комплексным процессом, развитие которого можно разделить на три основных этапа: прямой токсический эффект на эпителиальные клетки проксимальных канальцев, приводящий к некрозу или апоптозу клеток; развитие воспалительной реакции; развитие тубулоинтерстициального фиброза [78; 95]. Раннее цитотоксическое действие цисплатина обычно связано с сильной воспалительной реакцией, сопровождаемой поражением сосудистого эндотелия в почечной ткани, которое приводит к ишемическим нарушениям, к снижению СКФ и в итоге – к острой почечной недостаточности [66].

В последние годы открыты и изучены биомаркеры, ассоциированные с ранними стадиями ОПН. Эти маркеры позволяют диагностировать нефротоксичность до того, как значительная часть функции почек будет утрачена [24]. Основной характеристикой раннего маркера является точное, безошибочное предсказание возникновения нарушения клеточных структур различных участков нефрона и корреляция его уровня в моче или в сыворотке с тяжестью этих нарушений [61].

Цисплатин вызывает поражения в проксимальных отделах канальцев у человека и у многих видов животных [32]. Показано, что крысы, получавшие цисплатин в высоких дозах, являются хорошей моделью для изучения поражений, возникающих в почечных канальцах, поскольку наблюдается картина повреждений, не отличающаяся от таковой у человека [94; 95]. Эта модель нефротоксичности детально изучена и характеризуется точно установленным локусом и тяжестью поражения [73]. В настоящее время она широко используется в исследованиях, направленных на поиск и изучение биомаркеров нефротоксичности, связанной с поражением проксимальных отделов почечных канальцев [32]. Используя эту модель, Tomomiga Y. et al. исследовали 12 уринальных маркеров нефротоксичности: тотальный белок, альбумин, МПП-1, кластерин,  $\beta$ 2-микроглобулин, цистатин С, Г-S-T- $\alpha$ , Г-S-T- $\mu$ , N-АГ, ЛДГ, АСТ и АНЖЛ [82]. Через 24 ч после введения цисплатина наблюдалось увеличение в моче уровней следующих маркеров: МПП-1, Г-S-T- $\alpha$ , Г-S-T- $\mu$ , ЛДГ. Увеличение имело временную зависимость. Наиболее ранние и значительные увеличения были отмечены для МПП-1 – маркера, повышение экспрессии которого является специфичным при поражениях проксимальных отделов почечных канальцев и связано с ранним ответом эпителиальных клеток на токсическое воздействие [33]. Высокая диагностическая чувствительность показана и для Г-S-T- $\mu$ , который, как известно, яв-

ляется ранним маркером поражений дистальных отделов канальцев. Несмотря на то, что никаких морфологических изменений в этом отделе нефрона не наблюдали, авторы предположили, что увеличение в моче Г-S-T- $\mu$ , могло быть связано в их опытах также с поражением дистальных канальцев, так как имеются наблюдения, что цисплатин может оказывать токсический эффект на клетки петли Генле и дистальных отделов канальцев [74]. Значительные увеличения были отмечены для Г-S-T- $\alpha$  – маркера специфичного для поражения клеток S<sub>3</sub> сегмента проксимальных канальцев, хотя его увеличение было выражено в меньшей степени, чем МПП-1. Высокая чувствительность была показана и для ЛДГ. Однако известно, что этот фермент во всех отделах нефрона и не является специфичным для какого-то определенного участка. Таким образом, наблюдалось увеличение преимущественно маркеров специфичных для ранних поражений проксимальных канальцев МПП-1 и Г-S-T- $\alpha$  [40]. В настоящее время накоплено достаточное количество экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что МПП-1 является хорошим маркером для диагностики ОПП, развивающихся после введения различных нефротоксических препаратов, включая цисплатин [41]. При исследовании диагностической значимости 4 маркеров (МПП-1, СКр, АМК и N-АГ) на различных моделях нефротоксичности, в том числе – с использованием цисплатина, показано, что уровень уринального МПП-1 положительно коррелирует с уровнем морфологических нарушений в эпителии проксимальных канальцев. Даже при незначительных морфологических изменениях МПП-1 оказался единственным из 4 маркеров, способным рано определить эти поражения [89]. Оценена способность идентифицировать ранние поражения почек у крыс после однократного внутрибрюшинного введения цисплатина с помощью следующих маркеров: МПП-1, Г-S-T- $\alpha$ , альбумин, АНЖЛ, остеоопонтин, Г-S-T- $\mu$ , РПА-1, кластерин [53]. Изменения уровней маркеров были соотнесены с морфологическими изменениями, наблюдаемыми в различных отделах нефрона. Показано, что повышение в моче уровней МПП-1, Г-S-T- $\alpha$  и альбумина коррелировало с появлением и развитием ранних признаков поражения проксимальных канальцев. Увеличению уровня МПП-1 в моче предшествовало увеличение экспрессии этого белка в эпителиальных клетках канальцев, а увеличение Г-S-T- $\alpha$  было связано с увеличением его высвобождения из поврежденных клеток канальцев. Увеличение уровня тотального альбумина в моче являлось следствием нарушения процессов реабсорбции в проксимальных отделах почечных канальцев. Несмотря на то, что этиология повышения уровней этих маркеров различна, они показали большую чувствительность и специфичность в идентификации ранних поражений почечных канальцев, чем другие исследуемые маркеры, включая СКр и АМК. Многократное увеличение в моче МПП-1 отмечали Vaidya V.S. et al. у крыс через 24 ч после введения цисплатина, в то время как уров-

ни СКр, АМК и N-АГ не изменялись. Авторами отмечена четкая связь между уровнем маркера в моче и тяжестью морфологических изменений в проксимальных канальцах [87]. Значительное увеличение Г-S-T- $\alpha$  наблюдали Gautier J.C. et al. в первые 48 ч после введения цисплатина крысам линий Han Wistar и Spraque-Dawley. Повышение уровня маркера в моче происходило одновременно с развитием некроза в клетках S<sub>3</sub> сегмента. Увеличение уровня фермента наблюдалось раньше и было более выражено, чем увеличение АМК, N-АГ, СКр и тотального белка. Два других маркера Г-S-T- $\mu$  и РПА-1, исследуемые в этой работе, также увеличивались, но в более поздние (на 5 день после введения препарата) сроки [32]. Увеличение Г-S-T- $\mu$  и РПА-1, по предположению авторов, связано с нарушениями в дистальных отделах нефрона, которые являются следствием поражения проксимальных канальцев. В этих исследованиях отмечены линейные различия в чувствительности к токсическому действию цисплатина у крыс. Значительное повышение этого маркера отмечали у больных с опухолями головы и шеи через 6 ч после введения цисплатина. Подъем уровня Г-S-T- $\alpha$  наблюдался задолго до повышения СКр [75].

В исследовании Vinken P. et al. изучалась динамика изменений в моче и в ткани почек крыс трёх маркеров (МПП-1, остеоопонтин и кластерин) после однократного внутрибрюшинного введения цисплатина. Через 24 ч отмечено увеличение экспрессии МПП-1 в клетках проксимальных канальцев с последующим 20-кратным повышением уровня этого маркера в моче. Авторы отметили, что МПП-1 и кластерин в моче являлись самыми чувствительными маркерами для диагностики поражений, индуцированных цисплатином, и должны быть включены в доклинические токсикологические исследования [90].

Экспериментально на мышах показано, что нефротоксичность, вызванная цисплатином, сопровождается ранним значительным повышением АНЖЛ [55]. Увеличение АНЖЛ наблюдали в моче через 3 ч после внутрибрюшинного введения препарата в дозе, вызывающей некроз и апоптоз клеток проксимальных канальцев. Увеличение маркера происходило значительно раньше, чем увеличение N-АГ и СКр и до того, как регистрировались изменения в СКФ. В связи с этим авторы сделали вывод, что уринальный АНЖЛ может являться ранним маркером диагностики почечных поражений, вызванных цисплатином. Увеличение этого маркера в моче наблюдали также у больных с различными солидными опухолями на 1–3; 7 и 15 дни после лечения цисплатином [31]. Однако Kos FT et al. не наблюдали никакой корреляции между уровнем сывороточного АНЖЛ и развитием почечных поражений у больных после введения цисплатина [44]. N-АГ, ГГТ, ЛДГ и тотальный белок использовались в работе Uehara T. et al. для оценки нефротоксического эффекта недоплатина в сравнении с цисплатином. Уровень этих маркеров в моче крыс достигал максимальных значений на 4 день после

введения препаратов и возвращался полностью или частично к нормальному лишь к 7 дню. При этом введение цисплатина вызывало повышение этих маркеров в большей степени, чем введение недоплатина, который обладает меньшим нефротоксическим эффектом. В этих исследованиях авторы наблюдали у крыс гендерные различия в уровне указанных маркеров в моче. В контрольной группе они, особенно ГГТ, были значительно ниже у самок, чем у самцов [85]. Devarajan P. et al. использовали N-АГ как чувствительный маркер поражения проксимальных канальцев, для сравнительного изучения нефротоксического эффекта липоплатина и цисплатина. Показано, что тяжесть токсического эффекта положительно коррелировала с уровнем маркера в моче. Гибель эпителиальных клеток, вызываемая цисплатином, сопровождалась многократным увеличением этого маркера, достигавшим максимума на 5 день после введения препарата. При введении липоплатина поражения клеток канальцев были незначительными, и уровень N-АГ повышался незначительно. Таким образом, этот маркер позволяет оценить тяжесть структурных нарушений в канальцевом аппарате почек [22]. Появление в моче ферментов (ферментурия) ЛДГ, ГГТ и N-АГ широко используется в течение многих лет для оценки нефротоксического действия цисплатина и его производных, поскольку данные ферменты считаются чувствительными маркерами поражения канальцев. Wolfgang GH et al., исследуя нефротоксичность карбоплатина в сравнении с цисплатином, показали, что повышение уровня каждого из этих маркеров в моче крыс зависит от тяжести токсического воздействия препарата. ЛДГ оказался самым чувствительным индикатором токсичности. Его уровень увеличивался в 6 раз при введении цисплатина, в то время как введение карбоплатина, менее токсического препарата, не изменило уровень ЛДГ по сравнению с контролем. Уровни ГГТ и N-АГ были умеренно увеличены при введении обоих препаратов [93]. В настоящее время надежным и многообещающим маркером ранних поражений рассматривают белок нетрин-1, так как его увеличение наблюдали в ранние сроки развития ОПП разной этиологии, в том числе – и при действии нефротоксических препаратов [71]. Внутрибрюшинное введение мышам цисплатина в дозе 20 мг/кг приводило к 10-кратному увеличению уровня этого белка в моче через 1 час, а пик достигался через 6 часов после инъекции. В то же время увеличение СКр и АМК наблюдалось только через 72 часа. Показано, что нетрин-1 усиливает пролиферацию клеток и процессы регенерации в ответ на повреждение, поэтому он может быть использован как прогностический маркер восстановления почечных канальцев [9]. Faubel S. et al. отмечали возрастание уровня ИЛ-18 при развитии ОПП, вызванном введением цисплатина [28]. Ряд исследователей полагают, что ИЛ-18 по своей чувствительности и специфичности схож с АНЖЛ, но уступает другим маркерам, таким как МПП-1 и цистатин С [15]. Однако этот белок недостаточно хо-

рошо изучен в качестве маркера для установления ранних поражений, вызываемых различными лекарственными препаратами. Интересные результаты были получены при изучении L-БСЖК в качестве маркера ранних поражений, вызванных введением цисплатина. Исследования выполнены на трансгенных мышах, так как этот белок представлен в клетках проксимальных канальцев человека и отсутствует у мышей. Показано, что уровень маркера увеличивается в моче уже через два часа после введения препарата, в то время как повышение традиционных маркеров (АМК и СКр) наблюдается через 48 ч. Была установлена четкая корреляция между тяжестью патоморфологических изменений и уровнем L-БСЖК в моче. Увеличение этого маркера напрямую зависело от дозы цисплатина. Авторы считают, что токсические поражения, вызываемые цисплатином, могут быть предсказаны с помощью уринального L-БСЖК точнее и раньше, чем с помощью других маркеров [61]. По уровню кластерина и микроальбумина в моче крыс показано: карбоплатин так же, как цисплатин, преимущественно, хотя и в меньшей степени, поражает проксимальные отделы почечных канальцев. Эти нарушения сопровождались увеличением уровней кластерина и микроальбумина [26].

Vinken P. et al. показали, что традиционные маркеры СКр и АМК не могли быть использованы у крыс для раннего обнаружения почечных поражений, вызванных введением цисплатина. Уровень кластерина в моче и экспрессия МПП-1 в эпителиальных клетках проксимальных канальцев были самыми чувствительными маркерами для оценки раннего проявления нефротоксичности. Увеличение уровня МПП-1 и остеопонтина в моче коррелировали с прогрессией почечного поражения. Авторы пришли к выводу, что в токсикологических исследованиях новых препаратов гистохимические исследования следует сочетать с измерением уровня МПП-1 и остеопонтина в моче [90].

В настоящее время установлено, что для идентификации ранних поражений почек наиболее информативны маркеры, определяемые в моче. Маркеры же, определяемые в сыворотке крови, свидетельствуют о более поздних и тяжелых поражениях [23]. Оценка диагностической эффективности новых уринальных биомаркеров нефротоксичности цисплатина у крыс проведена в серии исследований Pinches M. et al. [67]. Авторы использовали традиционные маркеры мочи (глюкоза, тотальный белок и N-АГ) и 7 новых (альбумин, Г-S-T- $\alpha$ , Г-S-TYb1, АНЖЛ, МПП-1, остеопонтин, RPA-1). Уровни МПП-1, остеопонтина и альбумина коррелировали со степенью тяжести поражения проксимальных канальцев.

Использование ROC-анализа показало, что диагностическая эффективность большинства новых биомаркеров, за исключением Г-S-T- $\alpha$ , Г-S-TYb1 и цистатина С, значительно превосходит таковую АМК и СКр. В этих работах были исследованы биологические вариации и установлены референс значения новых уринальных маркеров у крыс.

Таким образом, общим характерным признаком, ассоциированным с нефротоксичностью препаратов платины, является поражение эпителиальных клеток почечных канальцев. Для диагностики ранних стадий развития осложнений, вызванного этими препаратами, при ОПП следует использовать маркёры поражения эпителия почечных канальцев.

Комбинация биомаркёров ОПП. Создание мультиплексных диагностических систем

Возникновение и развитие ОПП является сложным, многостадийным процессом, который невозможно охарактеризовать с помощью одного маркёра. Все существующие на сегодняшний день маркёры нефротоксичности, индуцированной фармпрепаратами, не имеют достаточной чувствительности и специфичности. Вследствие этого они ограниченно пригодны для диагностики ранних поражений почек. Одновременное измерение нескольких маркёров и их сравнительный анализ оказываются более информативными и надежными в диагностике ОПП, чем применение одного маркёра, даже самого чувствительного [11; 21]. Для большинства биомаркёров нефротоксичности разработаны диагностические иммуноферментные наборы на основе ИФА, которые имеют как преимущества, так и недостатки. Основным преимуществом является возможность измерения низких концентраций биомаркёров, а недостатком – узкий динамический диапазон и возможность измерения в одном образце только одного анализата.

Разработка методов мультиплексного анализа на основе технологии Luminex xMAP позволяет одновременно измерять до ста маркёров в одном образце небольшого объема мочи, плазмы или сыворотки.

Преимущество Luminex xMAP технологии состоит в возможности нанесения «зондов» по индивидуальному протоколу и созданию гибких схем, лёгкой оптимизации анализа под условия конкретного эксперимента. В настоящее время разработаны диагностические наборы с различными комбинациями маркёров нефротоксичности для крыс (и человека), которые обеспечивают определение основных биомаркёров спустя несколько часов после действия повреждающих агентов, что позволяет быстро и эффективно тестировать лекарственные средства до начала клинических испытаний [30]. Комбинирование маркёров является трудной задачей и требует дальнейших исследований, так как на сегодняшний день нет чёткого представления о том, в каких сочетаниях объединять маркёры в панели для диагностики ОПП разной этиологии, каким должно быть их оптимальное соотношение и т.д. [34].

Для изучения нефротоксического эффекта цисплатина и других производных платины наряду с традиционными функциональными маркёрами (СКр, АМК) используют разнообразные маркёры, которые могут быть классифицированы как ферменты, высвобождаемые из поврежденных клеток канальцев (ЩФ, ГГТ, АЛТ, ЛДГ, Г-S-Ts, N-АГ), низкомолекулярные белки ( $\alpha$ 1-микроглобулин,  $\beta$ 2-

микроглобулин, РСБ, цистатин С) и белки, продуцируемые клетками канальцев в ответ на поражение (МПП-1, липокалин 2, L-FABP, ИЛ-18). Открытие в будущем новых маркёров и детальное изучение уже известных позволит создать панель маркёров, способных предсказать нефротоксический эффект, индуцированный препаратами платины [46; 60].

Использование современных технологий для поиска потенциальных биомаркёров ОПП

В последние годы осуществлен значительный прогресс в идентификации новых биомаркёров раннего поражения почечных канальцев у лабораторных животных и у человека [49]. Развитие геномных, транскриптомных, протеомных и метаболомных технологий способствовало открытию новых более перспективных современных маркёров – ДНК-овых, транскрипционных и метаболитических. Такие маркёры расширят возможность своевременного отслеживания начала и обратимости возникших поражений. Изменения в экспрессии генов являются самыми ранними признаками токсического воздействия и наступают значительно раньше, чем морфологические изменения [7; 43]. ДНК-овые микрочипы становятся стандартной технологией в молекулярной токсикологии. Они позволяют одновременно отслеживать экспрессию большого количества генов. Применение микрочипов в исследованиях ренальных поражений позволило идентифицировать ранние изменения в экспрессии генов и сопоставить их с точной локализацией поражения в структурах почки [43]. В настоящее время делаются попытки с помощью ДНК-чипов классифицировать нефротоксические соединения на основе профиля экспрессии генов. Huang Q. et al. изучали экспрессию генов при развитии нефротоксичности, вызванной цисплатином, используя *in vivo* и *in vitro* системы [39].

У крыс после введения цисплатина в дозе, вызывающей тубулярный некроз, были отмечены изменения в экспрессии генов окислительного стресса, регуляторов концентрации внутриклеточного кальция (SMP30), ингибиторов клеточного цикла (waf1), генов МЛУ (MDR1), генов, кодирующих белки кластерин, JGFBP-1 и ТИМП-1. В печени крыс никаких нарушений в генной экспрессии не наблюдали.

Сравнивая профили экспрессии *in vivo* и *in vitro*, авторы обнаружили значительные различия между этими системами. Это позволило авторам сделать вывод: данные, полученные *in vitro*, следует с осторожностью переносить на модели *in vivo*.

Thompson K.L. et al., используя технологию ДНК-микроррей для неклинической оценки нефротоксичности цисплатина, идентифицировали генные маркёры и показали, что профиль генной экспрессии связан со специфичностью поражения ткани и механизмом токсичности. Идентифицировано 93 гена с разным уровнем экспрессии у крыс, получавших цисплатин.

Показано, что экспрессия генов, связанных с клеточной адгезией (Spp1, Coll1a1, Clu, Lgals3) и с

энзимами детоксикации (Г-S-Tm2, Г-S-Tr2) была снижена, а экспрессия генов, локализованных в проксимальных канальцах (Odc1, Oat, Kap) и генов, кодирующих ростовые факторы и их связывающие белки (Egf, Ghr, Ngfg, Igfbp3), была увеличена [80]. Uehara T. et al., изучая генный профиль у крыс после однократного введения недоплатина, показали увеличение экспрессии генов, связанных с апоптозом, регуляцией клеточного цикла, метаболизмом ДНК, миграцией и адгезией клеток, организацией цитоскелета и оксидативного стресса (Hmax1, Mtl1, Glrx1, Г-S-Tm1).

Показано значительное повышение экспрессии генов, кодирующих цитокератины 14 и 19, что, по предположению авторов, могло быть связано с особенностями регенерации эпителия сосочков и собирательных трубок, наблюдаемой после введения недоплатина. Изучение картины экспрессии генов позволило авторам сделать вывод, что механизм действия недоплатина так же, как цисплатина, связан с оксидативным стрессом [86].

В настоящее время экспрессия генов, связанных с различными типами токсичности, интенсивно изучается. В частности – с целью установления генов, которые могут быть использованы как маркёры ранних почечных поражений.

Благодаря молекулярно-генетическим методам исследований были выявлены гены, которые в результате токсического воздействия подвергаются ранней индукции и усиленной экспрессии. Белки, кодируемые этими генами (МПП-1, кластерин, АНЖЛ) признаны новыми, более совершенными, чем традиционные, маркёрами для диагностики ОПП [7]. Показано, что увеличение экспрессии гена МПП-1 происходит раньше, чем наблюдаются морфологические изменения.

Установлена корреляция между уровнем генной экспрессии и тяжестью поражения. Увеличение экспрессии МПП-1 наблюдается даже при дозах препарата, не вызывающих изменения морфологической картины [14].

Применение метаболомных исследований в поиске биохимических маркёров ОПП, вызванных цисплатином.

В последние годы кроме геномных и протеомных подходов в поиске новых маркёров используют метаболомные технологии, основанные на определении профиля продуктов метаболизма. Это принципиально новый тип маркёров, включающий аминокислоты, пептиды, полиамины и т.д., которые, как оказалось, могут идентифицировать ранние поражения почек, вызванные введением токсических препаратов. Если раньше изучалась лишь небольшая часть компонентов метаболизма биологических систем, сейчас с помощью новых аналитических методов можно получить полный метаболомный профиль этих систем.

Для метаболомного анализа могут быть использованы самые современные аналитические методы: масс-спектрометрия, спектроскопия ядерного магнитного резонанса, высокоэффективная жидкостная хроматография и др.

Одна из основных задач метаболомных исследований состоит в определении раннего метаболомного профиля токсичности, который может быть использован (индивидуально) в оценке качества и безопасности лекарственных препаратов для человека и животных. Portilla D. et al. проводили биохимический анализ эндогенных метаболитов в сыворотке, моче и ткани почек мышей после однократного введения цисплатина [68; 69].

Показано, что цисплатин вызывал в моче мышей уникальный метаболомный профиль, который может быть биомаркёром нефротоксичности. Этот профиль характеризовался повышенными уровнями глюкозы; таких аминокислот, как аланин, валин, лейцин, метионин; присутствием метаболитов трихлоруксусной кислоты – пируватов и лактатов. Изменения в метаболоме мочи происходили рано и предшествовали увеличению уровня СКр и, как отмечали авторы, были связаны с механизмом токсического действия цисплатина на проксимальные отделы почечных канальцев.

### Заключение

Нефротоксичность является одним из самых тяжелых и серьезных побочных эффектов применения цисплатина и других препаратов платины, а также многих других лекарств. К настоящему времени синтезировано и используется в противоопухолевой терапии большое количество новых препаратов на основе платины, которые проявляют различную степень нефротоксичности.

Эти различия связаны с фармакинетическими свойствами новых производных. Так как аналоги цисплатина (карбоплатин, недоплатин, оксалиплатин и др.) содержат токсичную для почек платину, они сохраняют нефротоксичность, хотя и в меньшей степени, чем цисплатин.

В течение многих лет для оценки индуцированной лекарствами нефротоксичности использовали функциональные маркёры (СКр и АМК) и энзимы (N-АГ, ГГТ, ЩФ, ЛДГ). Однако первые признаки токсического эффекта возникают очень рано и для их установления нужны новые, более совершенные маркёры. Разработанная на крысах модель нефротоксичности, индуцированной цисплатином, широко используется в исследованиях, направленных на поиск биомаркёров, связанных с поражением почечных канальцев.

Открытые в последние годы белковые маркёры (МПП-1, липокалин 2, РПА-1, нетрин-1, Тф3, L-БСЖК) обладают достаточной чувствительностью, чтобы предсказать токсичность препарата на этапе доклинических испытаний и направить дальнейшие исследования на создание производных, действующих на ту же мишень, но не проявляющих токсичность.

В настоящее время для изучения нефротоксического эффекта кандидатов в лекарства наряду с традиционными функциональными маркёрами (СКр, АМК) используются разнообразные маркёры (см. табл.).

Таблица

Некоторые уринальные биомаркеры, предсказывающие поражённую область нефрона и препараты-индукторы нефротоксичности [11; 30]

Отдел нефрона	Уринальный биомаркер	Примеры повреждающих препаратов
Клубочки	Тотальный белок, цистатин С, $\alpha$ -1-микроглобулин, $\beta$ 2-микроглобулин, альбумин, МИФ, подоцин	пурамицин
Проксимальные канальцы	$\alpha$ -1-микроглобулин, $\beta$ 2-микроглобулин, МПП-1, кластерин, Г-S-T- $\alpha$ , цистатин С, VEGF, АНЖЛ, ТИМП-1, N-АГ, нетрин-1, РСБ, ИЛ-18, ФРГ, Сур61, Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> обменник-3, экзосомальный фетуин-А, L-БСЖК, тотальный белок, ТфЗ	цисплатин, карбоплатин, гентамицин и другие аминогликозиды
Петля Генле	ОПН, Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> обменник-3,	<i>Анальгетики</i>
Дистальные канальцы	ОПН, кластерин, кальбиндинD28, VEGF, АНЖЛ, Г-S-T- $\alpha$ / $\mu$ , H-БСЖК	недоплатин
Собирательные трубки	кальбиндинD28, РПА-1	недоплатин, нестероидные противовоспалительные лекарства

Это могут быть энзимы, высвобождаемые из поврежденных клеток канальцев (ЩФ, ГТТ, АЛТ, ЛДГ, Г-S-Ts, N-АГ), низкомолекулярные белки ( $\alpha$ 1-микроглобулин,  $\beta$ 2-микроглобулин, РСБ, цистатин С) и белки, продуцируемые клетками канальцев в ответ на поражение (МПП-1, липокалин2, L-БСЖК, нетрин-1, РПА-1, ИЛ-18). Детальное изучение уже известных и открытие в будущем новых маркеров позволит создать панель маркеров, способных предсказать нефротоксический эффект препаратов. Разработанные мультиплексные диагностические системы, дают возможность исследовать различные комбинации маркеров нефротоксичности для человека и крыс, обеспечивают определение основных маркеров спустя несколько часов после воздействия повреждающих агентов. Возрастает возможность эффективного тестирования лекарственных средств до начала клинических испытаний.

Развитие геномных и протеомных технологий на основе микрочипов способствует открытию новых, более перспективных, современных маркеров: геномных, транскрипционных и метаболических. Так, выявлены гены, которые в результате токсического воздействия цисплатина, подвергаются ранней индукции и усиленной экспрессии. Изучение генной экспрессии позволит установить гены, которые могут быть использованы как маркеры ранних почечных поражений. Применение метаболомных технологий позволяет установить уникальный метаболомный профиль, характерный для нефротоксичности, индуцированной платиновыми препаратами. Показано, что изменения в метаболоме мочи происходят рано, предшествуют увеличению уровня СКр и связаны с механизмом токсического действия цисплатина на проксимальные отделы почечных канальцев.

### Литература

1. Абаев В.М., Любимова Н.В., Михайлова Л.М. и др. Экспериментальное исследование токсического действия циклоплатина на почки и печень // Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. – 2000. – №3. – С. 43–51.
2. Вельков В.В., Резникова О.И. *Современная лабораторная диагностика ренальных патологий: от ранних стадий до острой почечной недостаточности* // Лабораторная диагностика. – 2010. – Т. 4, № 54. – С. 59–65.
3. Купчан Д.З. Характеристика отдельных противоопухолевых препаратов. Переводчикова Н.И. (ред.) Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. 3-е изд., доп. и пер. – М.: Практическая медицина, 2011. – С. 72–119.
4. Кушлинский Н.Е., Любимова Н.В., Дурнов Л.А. и др. *Значение ферментурии в оценке нефротоксичности противоопухолевых химиотерапии у детей* // БЭБМ – 1997. – №10. – С. 446–50.
5. Любимова Н.В., Топчиева С.В., Аверинова С.Г. и др. *Современные методы диагностики и мониторинга нефротоксичности при проведении противоопухолевой химиотерапии производными платины* // БЭБМ. – 2000. – № 9. – С. 317–23.
6. Поддубная И.В., Орёл Н.Ф. Побочные реакции и осложнения лекарственной терапии. Поражение мочевыводящей системы. Переводчикова Н.И. (ред.) Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. 3-е изд., доп. и пер. – М.: Практическая медицина, 2011. – С. 425–46; 437–9.
7. Amin R.P., Vickers A.E., Sistare F. et al. *Identification of putative gene based markers of renal toxicity* // Environ Health Perspect. – 2004. – 112(4) – P. 465–79.
8. Bailly V., Zhang Z., Meier W. et al. *Shedding of kidney injury molecule 1 a putative adhesion protein involved in renal regeneration* // J.Biol.Chem. – 2002. – 277(42). – P. 39739–48.

9. Basnakian A.G. Netrin 1: universal biomarker for acute kidney injury // *Am.J.Physiol.Renal.Physiol.* – 2008. – 294(4). – P. F729–30.
10. Bondiou M.T., Bourbouze R., Bernard M. et al. *Inhibition of A and B N-acetyl-beta-D-glucosaminidase urinary isoenzymes by urea* // *Clin Chim Acta.* – 1985. – 149(1). – P. 67–73.
11. Bonventre J.V., Vaidya V.S., Schmodder R. et al. *Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity* // *Nat.Biotechnol.* – 2010. – 28(5). – P. 436–40.
12. Boulikas T., Vougiouka M. *Cisplatin and platinum drugs at the molecular level* // *Oncol.Rep.* – 2003. – 10(6). – P. 1663–82.
13. Chinery R., Poulson R., Elia G. et al. *Expression and purification of a trefoil peptide motif in a beta-galactosidase fusion protein and its use to search for trefoil-binding sites* // *Eur.J.Biochem.* – 1993. – 212. – P. 557–63.
14. Chiusolo A., Defazio R., Zanetti E. et al. *Kidney injury molecule 1 expression in rat proximal tubule after treatment with segment-specific nephrotoxics: A tool for early screening of potential kidney toxicity* // *Toxicol Pathology.* – 2010. – 38(3). – P. 338–45.
15. Coca S.G., Parikh C.R. *Urinary biomarkers for acute kidney injury: perspectives on translation* // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2008. – 3(2). – P. 481–90.
16. Correa-Roffer R. *Induction of clasterin in tubules of nephritic rats* // *J.Am.Soc.Nephrol.* – 1998. – 9. – P. 33–7.
17. Cristofori P., Zanetti E., Fregona D. et al. *Renal proximal tubule segment-specific nephrotoxicity: An review on biomarkers and histopathology* // *Toxicologic Pathology.* – 2007. – 35. – P. 270–5.
18. Critical Path Institute. *Letter of support for two rodent kidney safety biomarkers* // 2014. <http://c-path.org/programs/pstc/regulatory-successes/>
19. de Geus H.R., Betjes M.G., Bakker J. *Biomarkers for prediction of acute kidney injury: narrative review on current status and future challenges* // *Clin.Kidney J.* – 2012. – 5. – P. 102–8.
20. Devarajan P. *Emerging urinary biomarkers in the diagnosis of acute kidney injury* // *Expert.Opin.Med.Diag.* – 2008. – 2(4). – P. 387–98.
21. Devarajan P. *Emerging biomarkers for the early detection of acute kidney injury* // *Nephrology.* – 2010. – 5(2). – P. 38–44.
22. Devarajan P., Tarabishi R., Mishra J. et al. *Low renal toxicity of lipoplatin compared to cisplatin in animals* // *Anticancer Res.* – 2004. – 24 (4). – P. 2193–200.
23. Dharnidharka V.R., Kwon C., Stevens G. *Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis* // *J. Kidney Dis.* – 2002. – 40(2). – P. 221–6.
24. Dieterle F., Marrer E., Suzuki E. et al. *Monitoring kidney safety in drug development: emerging technologies and their implication* // *Curr.Opin.Drug Discov.Devel.* – 2008. – 11(1). – P. 60–71.
25. Dieterle F., Perentes E., Cordier A. et al. *Urinary clasterin,  $\beta_2$ -microglobulin and total protein as markers to detect drug-induced kidney injury* // *Nat.Biotechnol.* – 2010. – 28. – P. 463–9.
26. Dodiya H., Mukul J., Goswami S. *Study of urinary biomarkers for nephrotoxicity in Wistar rats* // *J.Pharmacol.Toxicol.* – 2011. – 6(6). – P. 571–9.
27. Falkenberg F.W., Hildebrand H., Lutte L. et al. *Urinary antigens as markers of papillary toxicity: I. Identification and characterization of rats kidney papillary antigens with monoclonal antibodies* // *Arch.Toxicol.* – 1996. – 71(1–2). – P. 80–92.
28. Faubel S., Lewis E.C., Reznikov L. et al. *Cisplatin induced acute renal failure is associated with an increase in the cytokines interleukin IL-1 $\beta$ , IL18, IL6, and neutrophil infiltration in the kidney* // *J.Pharmacol.Exp.Ther.* – 2007. – 322 (1). – P. 8–15.
29. Feinfeld D.A., Fuh V.L., Safirstein R. *Urinary glutathione-S-transferase in cisplatin nephrotoxicity in the rat* // *J Clin Chem Clin Biochem.* – 1986. – 24(8). – P. 529–32.
30. Fuchs T.C., Hewitt P. *Biomarkers for drug-induced damage and nephrotoxicity. An overview for applied toxicology* // *The AAPS Journal.* – 2011. – 13(4). – P. 615–31.
31. Gaspari F., Cravedi P., Mandalà M. et al. *Predicting cisplatin-induced acute kidney injury neutrophil gelatinase-associated lipocalin excretion: a pilot prospective case-control study* // *Nephron.Clin.Pract.* – 2010. – 115(2). – P. 154–60.
32. Gautier J.C., Riefke B., Walter J. et al. *Evaluation of new biomarkers of nephrotoxicity in two strains of rat treated with cisplatin* // *Toxicology Pathology.* – 2010. – 38(6). – P. 943–56.
33. Han W.K., Bailly V., Abichandani R. et al. *Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury kidney* // *Kidney International.* – 2002. – 62. – P. 237–44.
34. Han W.K., Waikar S.S., Johnson A. et al. *Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury* // *Kidney International.* – 2008. – 73. – P. 863–9.
35. Harpur E., Ennulat D., Hoffman D. et al. *Biological quantification of biomarkers of chemical-induced renal toxicity in two strains of male rat* // *Toxicological Sciences.* – 2011. – 122(2). – P. 235–52.
36. Harrison D.J., Kharbanda R., Cunningham D.S. et al. *Distribution of glutathione-S-transferase isoenzymes in human kidney: basis for possible markers of renal injury* // *J.Clin.Pathol.* – 1989. – 42. – P. 624–8.
37. Hofmeister R., Bhargava A.S., Günzel P. *Value of enzyme determinations in urine for the diagnosis of*

- nephrotoxicity in rats // *Clin. Chim. Acta.* – 1986. – 160(2). – P. 163–7.
38. Honore P.M., Joannes-Boyau O., Boer W. et al. *The early biomarker of acute kidney injury: in search of the Holy Grail // Intensive Care Med.* – 2007. – 33. – P. 1866–8.
  39. Huang Q., Dunn R.T., Jayadev S. et al. *Assessment of cisplatin-induced nephrotoxicity by microarray technology // Toxicol. Sci.* – 2001. – 63(2). – P. 196–207.
  40. Ichimura T., Hung C.C., Yang S.A. et al. *Kidney injury molecule-1 a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury // Am.J.Physiol.Renal.Physiol.* – 2004. – 286. – P. F552–63.
  41. Khan E., Batuman V., Lertora J.J. *Emergence of biomarkers in nephropharmacology // Biomark. Med.* – 2010. – 4(6). – P. 805–14.
  42. Kilty C., Doyle S., Hassett B. et al. *Glutathion-S- transferases as biomarkers of organ damage: application of rodent and canine  $\Gamma$ -S-T enzyme immunoassays // Chem.Biol.Interact* – 1998. – 111–112. – P. 123–5.
  43. Kondo C., Minowa Y., Uehara T. et al. *Identification of genomic biomarkers for concurrent diagnosis of drug induced renal tubular injury using a large-scale toxicogenomic database // Toxicology.* – 2009. – 265(1–2). – P. 15–26.
  44. Kos F.T., Sendur M.A., Aksoy S. et al. *Evaluation of renal function using the level of Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is not predictive of nephrotoxicity associated with cisplatin-based chemotherapy // Asian Pac. J. Cancer Prev.* – 2013. – 14(2). – P. 1111–4.
  45. Kurschel E., Metz-Kurschel U., Niederle N. et al. *Investigations on the subclinical and clinical nephrotoxicity of interferon- $\alpha$ 2B in patients with myeloproliferative syndromes // Ren.Fail.* – 1991. – 13. – P. 87–93.
  46. Lisowska-Myjak B. *Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury // Blood Purif.* – 2010. – 29. – P. 357–65.
  47. Litterst C.L., Gram T.E., Dedrick R.L. et al. *Distribution and disposition of platinum following intravenous administration of cis-diamminedichloroplatinum(II) (NSC 119875) to dogs // Cancer Res.* – 1976. – 36(7 PT 1). P. 2340–4.
  48. Litterst CL, LeRoy AF, Guarino AM. *Disposition and distribution of platinum following parenteral administration of cis-dichlorodiammineplatinum(II) to animals // Cancer Treat Rep.* – 1979. – 63(9–10). – P. 1485–92.
  49. Lock E.A. *Toxicological highlight. Sensitive and early markers of renal injury. Where are we and what is the way forward? // Toxicological Sciences.* – 2010. – 116(1). – P. 1–4.
  50. Ludwig T., Riethmüller C., Gekle M. et al. *Nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic cation transport // Kidney International.* – 2004. – 66. – P. 196–202.
  51. Maatman R.G., van de Westerlo E.M., van Kuppevelt T.H. et al. *Molecular identification of the liver and heart-type fatty acid-binding protein in human and rat kidney. Use of the reverse transcriptase polymerase chain reaction // Biochem.J.* – 1992. – 288(Pt.1). – P. 285–90.
  52. Mårtensson J., Martling C.R., Bell M. *Novel biomarkers of acute kidney injury and failure: clinical applicability // Brit.J.Anesthesia.* – 2012. – 109(6). – P. 843–50.
  53. Mc Duffie J.E., Ma J.Y., Sablab M. et al. *Time course of renal proximal tubule injury reversal and related biomarker changes in rats following cisplatin administration // Int.J.Toxicol.* – 2013. – 32(4). – P. 251–60.
  54. Mishra J., Ma Q., Prada A. et al. *Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury // J.Am.Soc.Nephrol.* – 2003. – 14(10). – P. 2534–43.
  55. Mishra J., Mori K., Ma Q. et al. *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin a novel early urinary biomarkers for cisplatin nephrotoxicity // Am.J.Nephrol.* – 2004. – 24(3). – P. 307–15.
  56. Mishra J., Mori K., Ma Q. et al. *Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin // Am.J.Soc.Nephrol.* – 2004. – 15. – P. 3073–82.
  57. Mishra J., Ma Q., Kelly C. et al. *Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation // Pediatr.Nephrol.* – 2006. – 21. – P. 856–63.
  58. Moran S.M., Myers B.D. *Course of acute renal of feature studied by a model of creatinine kinetics // Kidney International.* – 1985. – 27. – P. 928–37.
  59. Naidu S.G., Lee F.T. *Contrast nephrotoxicity: predictive value of urinary enzyme markers in a rat model // Acad.Radiol.* – 1994. – 1(1). – P. 3–9.
  60. Nasri H. *Comment on: A model for prediction of cisplatin-induced nephrotoxicity by kidney weight in experimental rats // J.Res.Med. Sciences.* – 2013. – 18(12). – P. 1119–200.
  61. Negishi K., Noiri E., Doi K. et al. *Monitoring urinary L-type fatty acid binding protein predicts histological severity of acute kidney injury // Amer.J. Pathology.* – 2009. – 174(4). – P. 1154–9.
  62. Osman N.M., Litterst C.L. *Effect of probenecid and N'-methylnicotinamide on renal handling of cis-dichlorodiammineplatinum-II in rats // Cancer Lett.* – 1983. – 19(1). – P. 107–11.
  63. Ostermann M., Philips B.J., Forni L.G. *Clinical review. Biomarkers of acute kidney injury: Where are we now? // Critical Care.* – 2012. – 16. – P. 233.
  64. Parikh C.R., Jani A., Melnikov V.Y. et al. *Urinary IL18 is a marker of human acute tubular necrosis // Am.J.Kidney Dis.* – 2004. – 43. – P. 405–14.
  65. Pasetto L.M., D'Andrea M.R., Brandes A.A. et al. *The development of platinum compounds and their possi-*

- ble combination // *Crit.Rev.Oncol.Hematol.* – 2006. – 60. – P. 59–75.
66. Perazella M.A., Moeckel G.W. *Nephrotoxicity from chemotherapeutic agents: clinical manifestations pathobiology and prevention therapy* // *Semin. Nephrol.* – 2010. – 30(6). – P. 570–81.
  67. Pinches M., Betts C., Bickerton S. et al. Evaluation of novel renal biomarkers with cisplatin model of kidney injury: gender and dosage differences // *Toxicol.Pathol.* – 2012. – 40. – P. 522–33.
  68. Portilla D., Li S., Nagothu K.K. et al. *Metabolomic study of cisplatin-induced nephrotoxicity* // *Kidney Int.* – 2006. – 69. – P. 2194–204.
  69. Portilla D., Schnackenberg L., Beger R.D. Metabolomics as an extension of proteomic analysis: study of acute kidney injury // *Semin Nephrol.* – 2007 – 27. – P. 609–20.
  70. Price R.G. *The role NAG (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase) in the diagnosis of kidney disease including the monitoring of nephrotoxicity* // *Clin.Nephrol.* – 1992. – 38(suppl.1). – P. S14–9.
  71. Reeves W.B., Kwon O., Ramesh G. *Netrin 1 and kidney injury. II. Netrin 1 as an early biomarkers of acute kidney injury* // *Am.J.Physiol.Renal.Physiol.* – 2008. – 294. – P. F731–8.
  72. Rosenberg M.E., Silkensen J. *Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations* // *Int.J.Biochem.Cell.Biol.* – 1995. – 27. – P. 633–45.
  73. Safirstein R., Winston J., Goldstein M. et al. *Cisplatin nephrotoxicity* // *Am.J. Kidney Dis.* – 1986. – 8. – P. 356–67.
  74. Sahni V., Choudhury D., Ahmed Z. et al. *Chemotherapy-associated renal dysfunction* // *Nat.Rev.Nephrol.* – 2009. – 5(8). – P. 450–62.
  75. Saleena U.V., Athiyamaan M., Vadhira B.M. et al. *Urinary  $\alpha$ -glutathione-s-transferase variations in cisplatin treated cancer patients with and without kidney injury* // *Internat.Conf. on Bioscience, Biochemistry, Bioinformatics. IPCBEE.* – 2012 – 31. – P. 32–9.
  76. Schentag J.J. *Specificity of renal tubular damage criteria for aminoglycoside nephrotoxicity in critically ill patients* // *J.Clin.Pharmacol.* – 1983. – 23(10). – P. 473–83.
  77. Schmidt-Ott K.M., Mori K., Kalandadze A. et al. *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-mediated iron traffic in kidney epithelia* // *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* – 2006. – 15(4). – P. 442–9.
  78. Taguchi T., Razaque M.S. *Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. Razaque MS, Taguchi T (eds): Cellular stress responses in renal diseases. Contrib.Nephrol. Basel: Karger, 2005. – 148. – P. 106–20.*
  79. Tesch G.H. *Serum and urine biomarkers of kidney disease: A pathophysiological perspective* // *Nephrology.* – 2010. – 15. – P. 609–16.
  80. Thompson K.L., Afshari C.A., Amin R.P. et al. Identification of platform-independent gene expression markers of cisplatin nephrotoxicity // *Environmental Health Perspectives.* – 2004. – 119(4). – P 488–94.
  81. Thukral S.K., Nordone P.J., Hu R. et al. *Prediction of nephrotoxicant action and identification of candidate toxicity-related biomarkers* // *Toxicol. Pathol.* – 2005. – 33. – P. 343–55.
  82. Tonomura Y., Tsuchiya N., Torii M. et al. *Evaluation of the usefulness of urinary biomarkers for nephrotoxicity in rats* // *Toxicology.* – 2010. – 273. – P. 53–9.
  83. Trevisan A., Cristofori P., Fanelli G. *Glutamine synthetase activity in rat urine as sensitive marker to detect S3 segment specific injury of proximal tubule induced by xenobiotics* // *Arch. Toxicol.* – 1999. – 73(4–5). – P. 255–62.
  84. Uchida K., Gotoh A. *Measurement of cystatin C and creatinine in urine* // *Clin.Chem.Acta.* – 2002. – 323. – P. 121–8.
  85. Uehara T., Watanabe H., Itoh F. et al. *Nephrotoxicity of a novel antineoplastic platinum complex nedaplatin: a comparative study with cisplatin in rats* // *Arch.Toxicol.* – 2005. – 79(8). – P. 451–60.
  86. Uehara T., Yamate J., Torii M. et al. *Comparative nephrotoxicity of cisplatin and nedaplatin mechanisms and histopathological characteristic* // *J.Toxicol.Patol.* – 2011. – 24. – P. 87–94.
  87. Vaidya V.S., Ramirez V., Ichimura T. et al. *Urinary kidney injury molecule 1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury* // *Am.J.Physiol.Renal.Physiol.* – 2006. – 290(2). – P. F517–29.
  88. Vaidya V.S., Ferguson M.A., Bonventre J.V. *Biomarkers of acute kidney injury* // *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* – 2008. – 48. – P. 463–8.
  89. Vaidya V.S., Ozer J.S., Frank D. et al. *Kidney injury molecule 1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in multi-site preclinical biomarker qualification studies* // *Nat.Biotechnol.* – 2010. – 28(5). – P. 478–85.
  90. Vinken P., Starckx S., Barale-Thomas E. et al. *Tissue kim-1 and urinary clusterin as early indicators of cisplatin-induced acute kidney injury in rats* // *Toxicol.Pathol.* – 2012. – 40(7). – P. 1049–62.
  91. Westhuyzen J., Endre Z.H., Reece G. et al. *Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit* // *Nephrol Dial Transplant.* – 2003. – 18(3). – P. 543–51.
  92. Whiting P.H., Brown P.A. *The relation between enzymuria and kidney enzyme activities in experimental gentamicin nephrotoxicity* // *Ren.Tail.* – 1996. – 18(6). – P. 899–909.

93. Wolfgang G.H., Dominick M.A., Walsh K.M. et al. *Comparative nephrotoxicity of a novel platinum compound cisplatin and carboplatin in male Wistar rats* // *Fund.Appl.Toxicology*. – 1994. – 22(1). – P. 73–9.
94. Yamate J., Tatsumi M., Nakatsuji S. et al. Immunohistochemical observations on the kinetics of macrophages and myofibroblasts in rat renal interstitial fibrosis induced by cis-diamminedichloroplatinum // *J. Compar. Phatol.* – 1995. – 112(1). – 27–39.
95. Yano R., Golbar H.M., Izawa T. et al. *Participation of bone morphogenetic protein (BMP)-6 and osteopontin in cisplatin (CDDP)-induced rat renal fibrosis* // *Exp Toxicol Pathol.* – 2015. – 67(2). – P. 99–107.
96. Yu Y., Jin H., Holder D. et al. *Urinary biomarkers trefoil factor 3 and albumine enable early detection of kidney tubular injury* // *Nat. Biotechnol.* – 2010. – 28(5). – P. 470–7.
97. Zhou Y., Vaidya V.S., Brown R.P. et al. *Comparison of kidney injury molecule-1 and other nephrotoxicity biomarkers in urine and kidney following acute exposure to gentamicin, mercury, and chromium* // *Toxicol Sci.* – 2008. – 101(1). – P. 159–70.

УДК 616-006-097

*И.Ж. Шубина<sup>1</sup>, А.В. Сергеев<sup>1</sup>, Л.Т. Мамедова<sup>1</sup>, Н.Ю. Соколов<sup>2</sup>, М.В. Киселевский<sup>1</sup>***СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПРОТИВООПУХОЛЕВОМ ИММУНИТЕТЕ**<sup>1</sup>ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва<sup>2</sup>ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента РФ, Москва**Контактная информация***Шубина Ирина Жановна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета НИИ ЭДнТО*

адрес: 115478 Москва, Каширское ш., 24; тел. +7(499)612-80-39

e-mail: [irinashubina@mail.ru](mailto:irinashubina@mail.ru)

Статья поступила 25.05.2015, принята к печати 10.08.2015.

**Резюме**

Проанализированы исследования последних лет, посвященные изучению механизмов противоопухолевого иммунитета. Рассмотрена роль врожденного и приобретенного, а также местного и системного иммунитета в формировании противоопухолевой защиты организма с привлечением клинических и экспериментальных исследований; свойства и значение опухолеассоциированных антигенов для практической онкологии. Показана роль различных иммунокомпетентных клеток, в том числе – Т-клеток, НК-клеток, ДК, опухолеассоциированных макрофагов, а также цитокинов в противоопухолевой иммунной защите организма. Изложена гипотеза «иммуноредактирования» и его роли в формировании механизмов противоопухолевого иммунитета.

**Ключевые слова:** противоопухолевый иммунитет, иммунокомпетентные клетки, иммуноредактирование.*I.Zh.Shubina<sup>1</sup>, A.V.Sergeev<sup>1</sup>, L.T.Mamedova<sup>1</sup>, N.Yu.Sokolov<sup>2</sup>, M.V.Kiselevsky<sup>1</sup>***CURRENT UNDERSTANDING OF ANTITUMOR IMMUNITY**<sup>1</sup>FSBI «N.N. Blokhin RCRC», Moscow<sup>2</sup>Central Clinical Hospital, Moscow**Abstract**

The review presents analysis of the papers that discuss mechanisms of antitumor immunity. The role of innate and adaptive immune reactions as well as local and systemic is considered in terms of immune defense in clinical and experimental studies. The article discusses characteristics and role tumor-associated antigens for clinical practice. Various types of immune effector cells, including T-cells, NK-cell, DC, tumor associated macrophages, etc., and cytokines, are discussed regarding their contribution into antitumor immune response. The authors also refer to the hypothesis of “immunoediting” and its part in antitumor immunity.

**Key words:** antitumor immunity, immune effector cells, immunoediting.**Введение**

Несмотря на огромные достижения в области иммунологии, роль иммунной системы в защите организма человека от злокачественных новообразований раскрыта далеко не полностью. Проблема взаимоотношений между неопластическими клетками и системами врожденного и приобретенного иммунитета находит отражение в основных принципах теории противоопухолевого иммунитета. Главное ее положение – это существование системы иммунологического надзора.

В начале XX века Пауль Эрлих [16] впервые высказал предположение о возможной роли иммунной системы в предотвращении возникновения злокачественных новообразований. В 1950-х г. Ф.М. Бернет сформулировал основные положения иммунологического надзора и его участия в тор-

можении, возникновении и развитии опухолевых клеток [8]. Последующие исследования продемонстрировали наличие опухолевых антигенов на химически и вирус-индуцированных опухолях у мышей и подтвердили состоятельность концепции иммунного надзора [27]. Накопленные в последние несколько лет данные убедительно свидетельствуют об определенной роли иммунной системы организма при возникновении, развитии и прогрессии злокачественного заболевания, также как и при образовании метастазов [32; 35]. У многих онкологических больных, хотя и не у всех, отмечается противоопухолевый клеточный или гуморальный иммунный ответ, или одновременно оба типа иммунной реакции на ОАА [40; 42]. Сам факт существования такого противоопухолевого иммунитета у больных со злокачественными новообразованиями указывает на тот факт, что в организме этих

больных может быть индуцирован более выраженный иммунный ответ на ОАА. Опухолевая прогрессия представляет собой многоступенчатый процесс, ведущий от единственной трансформированной клетки к массе неконтролируемо пролиферирующего злокачественного пула, который сопряжен с целой серией генетических изменений, происходящих в течение некоторого периода времени – месяцев или лет, в результате чего образуется устойчиво сформированная злокачественная опухоль. Однако в течение этого периода и иммунная система организма, и сами развивающиеся опухолевые клетки находятся в активном взаимодействии. Вновь образовавшиеся опухолевые клетки, которые распознаются эффекторами иммунитета, элиминируются. Затем они замещаются генетически трансформированными клонами, резистентными к воздействию иммунной системы, и таким образом дают начало гетерогенной популяции злокачественных клеток, обнаруживаемой в любой опухоли. Опухоль представляет собой генетически нестабильную структуру, появление новых генетических клонов, формирующих генетическую гетерогенность, обеспечивает выживаемость опухоли в условиях активной иммунной системы организма. Только те опухолевые клетки, которым удается избежать распознавания иммунокомпетентными клетками, смогут выжить, в то время как трансформированные клетки, распознаваемые иммунной системой, элиминируются сразу, как только образуются.

**Противоопухолевый иммунный ответ:  
врожденный и/или приобретенный**

Противоопухолевый иммунный ответ как частная реакция иммунной системы организма может реализовываться через механизмы и врожденного (естественный), и приобретенного (адаптивный) иммунитета. Врожденный иммунитет определяется эффекторными клетками или растворимыми факторами, которые естественным образом присутствуют в тканях и жидкостях организма и могут влиять на процесс опухолевого роста или выживаемость опухоли. Среди гемопоэтических клеток такие эффекторы, как макрофаги, гранулоциты, натуральные киллеры (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), Т-клетки не рестриктированные по МНС (главный комплекс гистосовместимости CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) и  $\gamma\delta$ Т-клетки, обладают естественной способностью элиминировать опухолевые клетки-мишени [53]. Кроме того, в сыворотке крови онкологических больных могут обнаруживаться естественные антитела со специфическими свойствами против поверхностных антигенов опухолевых клеток [18]. Другие сывороточные компоненты, такие как система комплемента, С-реактивный белок, связывающий маммозу белок и сывороточный амилоидный белок также играют важную роль в реализации врожденного иммунитета. Адаптивный иммунный ответ на опухоль требует участия Т-лимфоцитов, экспрессирующих Т-клеточный рецептор CD3<sup>+</sup> (TCR<sup>+</sup>), когда они распознают опухолевые пептиды, связанные с собственными молекулами МНС, которые экспрес-

сируются на поверхности АПК. До сих пор мало известно о молекулярных сигналах и субпопуляциях клеток, участвующих в направленном воздействии на АПК, таких как ДК, ведущем к реализации толерогенной, а не иммуногенной программы в ответ на экспрессию антигенов. Как было указано выше, опухоли также могут выступать в качестве АПК, хотя низкий уровень экспрессии молекул МНС I класса, МНС II класса, или и тех, и других на поверхности опухолевой клетки ведет к следующему: такие свойства АПК оказываются неэффективными [18]. Вероятно, ОАА захватываются ДК, находящимися у опухолевого очага, которые осуществляют процессинг антигенов и представляют их Т-клеткам в опухоль-дренирующих лимфатических узлах в форме тримолекулярного комплекса пептид- $\beta_2$ м-МНС [58]. Для реализации ответа адаптивного иммунитета необходимо наличие Т-лимфоцитов, экспрессирующих соответствующие TCR. Распознавание пептидов и связывание их с переменными доменами TCR инициирует сигнальные пути (сигнал 1), что ведет к активации Т-клеток [44]. Этот процесс подразумевает предшествующую сенсibilизацию и клональную экспансию Т-клеток памяти в ответ на соответствующий опухолевый эпитоп (анамнестический ответ или ответ памяти). С другой стороны, предшественники Т-клеток, экспрессирующие TCR, могут быть примированы соответствующими пептид-МНС лигандами на поверхности АПК, и последующие процессы на уровне противоопухолевых эффекторных клеток можно рассматривать как первичный иммунный ответ. В любом случае для развития иммунной реакции [4] необходимо участие костимулирующих молекул (сигнал 2). И, как только запущена пролиферация Т-клеток, становится необходимым присутствие определенных цитокинов (сигнал 3) для поддержания иммунного ответа [39]. Полученные данные указывают на ключевую роль сигнала 3 в развитии противоопухолевой иммунной реакции или ее прекращения [56]. Как и все иммунные реакции, специфический иммунный ответ на ОАА не продолжается до бесконечности, а, достигнув своего пика, затем сходит на нет, и восстанавливается баланс, существовавший до момента активации. Точный механизм прекращения иммунной реакции еще не определен, изучается роль регуляторных Т-клеток (Трег), а также других механизмов, контролирующих иммунную реактивность, однако ясно одно – события, происходящие в опухолевом микроокружении, играют доминирующую роль в этих реакциях.

Противоопухолевый иммунитет может быть местным или системным. Местная реакция *in situ* относится в основном к ОИЛ, которые накапливаются в области солидных опухолей, но роль которых в прогрессии опухолей все еще остается крайне противоречивой. Долгое время считалось, что ОИЛ представляют один из аспектов противоопухолевого иммунитета, однако, по мнению некоторых исследователей, ОИЛ являются жертвами опухолевого микроокружения, поскольку их эффек-

торные функции часто нарушены, предположительно – теми факторами, которые продуцирует опухоль [54]. Есть мнение о том, что неэффективный противоопухолевый ответ, опосредованный ОИЛ, способствует опухолевой прогрессии [42]. Системный противоопухолевый иммунитет, выраженный в виде реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) или в виде Т-клеточного ответа, который в различных исследованиях *ex vivo* регистрируют в периферической крови онкологических больных, продемонстрировать на самом деле сложно, и специфический ответ против ОАА представляется, скорее, иллюзорным. Тем не менее, с помощью высокочувствительного метода проточной цитометрии с использованием множественного окрашивания определяется количественное содержание лимфоцитов CD8<sup>+</sup>, специфичных к ОАА, и CD4<sup>+</sup> Т-клеток в периферической крови онкологических больных [38].

Таким образом, сделано заключение о том факте, что, в целом, злокачественные опухоли человека оказывают у этих больных глубокий супрессивный эффект как на местный, так и на системный противоопухолевый иммунитет.

#### Опухоль-ассоциированные антигены

Прогресс в разработке противоопухолевых вакцин в последнее время был в большей степени обусловлен доступностью хорошо охарактеризованных ОАА, многие из которых были обнаружены в последнее десятилетие [19].

Большинство из этих ОАА имеют в основе свои собственные белки, мутированные или каким-либо другим образом дифференцированно экспрессирующиеся в нормальных и опухолевых клетках, как это происходит с онкофетальными или раково-тестикулярными антигенами. Основные категории ОАА, указанные в литературе [10; 19], которые используются в качестве потенциальных базовых компонентов для иммунотерапии, включают следующие группы антигенов:

- онкофетальные:
  - α-фетопротеин (АФП),
  - раковоэмбриональный антиген (РЭА/СЕА);
- раково-тестикулярные (ст от англ. «*cancer testis*»):
  - MAGE-1,
  - BAGE,
  - GAGE,
  - NY-ESO-1/LAGE,
  - SAGE
 еще 35–40 антигенов *ct*, относящихся к хромосоме *x* (*ct-x*) или распределенных по всему геному (*не-x ct*);
- антигены меланомы человека:
  - MART-1/MELAN-A,
  - Gp100/pmel 17,
  - тирозидаза,
  - белки, ассоциированные с тирозиназой (TRP) 1 и 2,
  - протеогликан сульфата хондроитина (CSPG4);

- антигены глиомы человека:
  - рецептор α2 ИЛ–13,
  - Eph A2,
  - сурвивин (Survivin),
  - вариант III EGFR (EGFRvIII);
- антигены, ассоциированные с опухолями головы и шеи:
  - EGFR,
  - ВПЧ (HPV 16 or 18),
  - альдегид дегидрогеназа A1 (ALDH1);
- гиперэкспрессированные нормальные или измененные антигены:
  - антиген MUC-1,
  - циклин-B1,
  - простат-специфический антиген (ПСА).

Также расширенный список многосторонне охарактеризованных ОАА, которые могли бы быть использованы в противоопухолевых вакцинах, приводится в одной из публикаций исследователями NCI [48]. Список включает антигены, отвечающие критериям, разработанным группой экспертов NCI, которые предлагаются для использования в иммунотерапии при отборе наиболее многообещающих ОАА для дальнейшего изучения в клинических исследованиях.

Как указывалось выше, иммунный ответ на ОАА, даже на те, которые представляют собой измененные собственные антигены, может быть зарегистрирован в организме больного со злокачественной опухолью, однако в большинстве случаев отсутствует корреляция между результатами реакции на ОАА *in vitro* и прогнозом развития заболевания у пациентов. Это наблюдение находится в противоречии с многочисленными данными, полученными на опухолевых моделях экспериментальных животных, которые убедительно свидетельствуют, что при наличии эффективного противоопухолевого иммунитета опухоль не прогрессирует, а уже сформировавшаяся опухоль регрессирует [23]. В клинических исследованиях противоопухолевых вакцин у онкологических больных были изучены многие из хорошо охарактеризованных ОАА в надежде, что презентация этих антигенов примированными ДК позволит преодолеть трудности в генерации выраженного иммунного ответа в условиях терапевтического режима. В некоторых более поздних публикациях результатов клинических исследований отмечено, что многократные подкожные инъекции иммунногенного опухолевого пептида NY-ESO-1 плюс смесь двух сильных адъювантов, Монтанид ISA-51 и CpG7909, могут эффективно индуцировать устойчивый пептид-специфический иммунный ответ, а также значительно продлевать период выживаемости даже у больных с заболеванием поздней стадии, включая, кроме меланомы, различные солидные опухоли [43]. Такие публикации, демонстрирующие, что противоопухолевый ответ или ответ на вакцину, соответствуют клиническим результатам, позволяют предположить, что оптимизация стратегии применения вакцин может привести к преодолению иммунной супрессии, индуцированной опухолевым

ростом, и восстановить иммунный баланс, нарушенный развитием злокачественного заболевания.

#### **Иммунокомпетентные клетки и другие факторы в микроокружении опухоли**

Иммунный баланс поддерживает баланс цитокинов, продуцируемых эффекторами врожденного и приобретенного иммунитета. Иммунорегуляция 1 типа (клеточный иммунитет) осуществляется при участии стимулирующих цитокинов ИЛ-12 и ИФН-гамма, а гуморальный ответ (иммунорегуляция 2 типа) – при участии ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 и/или ТРФβ. Противоопухолевый иммунитет может осуществляться за счет функционирования ЦТЛ, которые способны напрямую оказывать цитотоксическое действие в отношении клеток-мишеней, в то время как при гуморальном иммунитете ввиду неиммуногенности (или низкой иммуногенности) опухолей специфические антитела не вырабатываются или же действие их неэффективно.

Эффекторы врожденного иммунитета, реализующие свои функции по механизму 1 типа – ДК, продуцирующие ИЛ-12, НК, НКТ и ИФН-гамма, являются главными факторами, активирующими ЦТЛ (Тц1), эффекторы противоопухолевого иммунитета, функция которых опосредована Тх1 (лимфоцитами). Т-клетки памяти CD8<sup>+</sup> (CD8m) и CD4<sup>+</sup> (CD4m) также продуцируют ИФН-гамма, стимулируя ранний ответ по 1 типу.

Напротив, эффекторные клетки 2 типа, продуцирующие ИЛ-4, ИЛ-10 и/или ТРФβ, подавляют иммунорегуляцию 1 типа и стимулируют механизм 2 типа приобретенного иммунитета, опосредованный Т-хелперами 2 типа (Тх2). Регуляторные Т-клетки (Трег) проявляют выраженную иммуносупрессивную активность в отношении противоопухолевого иммунитета.

Цитокины иммунного баланса продуцируются двумя субпопуляциями Т-хелперных клеток, Тх1 и Тх2. Тх1 продуцируют ИЛ-2 и ИФН-гамма, а Тх2 продуцируют ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-6. Тх1 играют решающую роль в реализации клеточного иммунитета, а Тх2 – гуморального иммунитета. Было показано, что цитотоксические Т-лимфоциты CD8<sup>+</sup> также подразделяются на субпопуляции Тц1, продуцирующие ИФН-гамма и Тц2, продуцирующие ИЛ-4 подобно субпопуляциям Тх.

Эффекторные клетки врожденного иммунитета, такие как ДК, НК, НКТ и γδТ-клетки, продуцируют различные цитокины, включая те, которые продуцируют Тх1 и Тх2. Таким образом, иммунный баланс контролируется различными типами иммунокомпетентных клеток, кроме Тх1 и Тх2. Иммунный ответ 1 типа индуцируется ДК, макрофагами МФ, НК, НКТ, γδТ и Тх1, Тц1-клетками, продуцирующими цитокины 1 типа иммунного ответа (ИЛ-12, ИФН-гамма, ИЛ-18), а иммунный ответ 2 типа стимулируется ДК, макрофагами МФ, НК, НКТ, γδТ и Тх2, Тц2-клетками, продуцирующими цитокины 2 типа иммунного ответа (ИЛ-4, ИЛ-10, ТРФβ). Регуляторные ДК, Трег CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клетки и продуцирующие ИЛ-10 Трег-1 клетки также участ-

вуют в контроле иммунного баланса типа1/типа2 через свою иммуносупрессивную функцию.

Когда патоген атакует организм, ДК первыми отвечают на его вторжение, распознавая последний с помощью Toll-like рецепторов. И продуцируют ИЛ-12, ИЛ-18, ИФН-гамма и/или ИЛ-10. ИЛ-12, продуцируемый ДК, наиболее значимый цитокин, активирующий НК, НКТ, Тх1 и Тц1, которые в свою очередь продуцируют ИФН-гамма. Также показано, что ДК могут представлять собой гетерогенные субпопуляции. ДК CD8α<sup>+</sup>, продуцирующие ИФН-гамма играют решающую роль в индукции иммунного ответа по механизму Тх1, в то время как регуляторные ДК, продуцирующие ИЛ10, угнетают клеточный иммунитет. Таким образом, ДК функционируют как эффекторные клетки врожденного иммунитета 1 и 2 типов, поскольку они продуцируют цитокины, активирующие, соответственно, Тх1 или Тх2.

Напротив, НК всегда выполняют функцию эффекторных клеток врожденного иммунитета 1 типа, продуцируя ИФН-гамма в ответ на ИЛ-12, выделяемый ДК, активированными патогеном. Хотя активированные ИЛ-12ым НКТ-клетки функционируют как эффекторы 1 типа, продуцирующие ИФН-гамма, αГалЦер (α-галактоцерамид) активированные НКТ иногда функционируют как эффекторы 2 типа, угнетая иммунный ответ по пути Тх1 тем, что продуцируют ИЛ-4, и ИЛ-13, и ИФН-гамма.

Чаще всего среди иммунокомпетентных клеток, обнаруживаемых в опухолевом микроокружении у онкологических больных, встречаются лимфоциты, которые способны определять как врожденный, так и адаптивный иммунитет. При этом также часто наблюдаются моноциты, (ОАМ/ТАМ) и ДК [45; 57]. Кроме того, клетки воспалительного процесса, обнаруживаемые в опухоли, находятся в тесном контакте с опухолевыми клетками, стромальными фибробластами, компонентами внеклеточного матрикса и кровеносными сосудами. Свой вклад в прогрессию опухоли могут вносить провоспалительные цитокины, секретируемые клетками, участвующими в воспалительном процессе, а растворимые факторы, продуцируемые опухолью в ответ на неспецифические или опухоль-специфические сигналы, такие как простагландин E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), аденозин или TGF-β снижают функциональную активность иммунных клеток [25; 55]. Опухолевое микроокружение формируется опухолью, опухоль доминирует и постоянно регулирует его состояние, направляет все клеточные и молекулярные процессы, которые происходят в окружающих тканях.

#### **Т-клетки**

Наибольшее внимание уделялось изучению Т-клеток (CD3<sup>+</sup>TCR<sup>+</sup>), составляющих основную популяцию инфильтрирующих мононуклеарных клеток, которые рекрутируются опухолью в составе иммунных компонентов [45]. Аккумуляция этих иммунокомпетентных клеток в опухолевой ткани может рассматриваться как подтверждение функ-

ции иммунологического надзора организма, однако они совершенно неэффективны в отношении торможения опухолевого роста, хотя эти же клетки могут проявлять пролиферативную и противоопухолевую цитотоксическую активность при их активации ИЛ-2 *ex vivo* после выделения этих клеток из опухолевой массы [9].

Последние данные о свойствах Т-клеток, обнаруживаемых в опухолях человека, свидетельствуют о том, что их фенотипический и функциональный профили варьируют в зависимости от микроокружения, сформированного опухолью, и этот профиль или «иммунологический портрет/подпись» («*immunologic signature*») может влиять на прогноз заболевания и его исход [51]. Оказалось, что в ОИЛ, полученных из метастатических новообразований или опухолей на поздней стадии, наблюдается больше функциональных нарушений, чем в ОИЛ, выделенных из опухолей на ранних стадиях, что опухолевый статус или способность опухоли подавлять иммунную систему может определять функциональное состояние инфильтрирующих Т-клеток. Среди инфильтрирующих опухоль CD4<sup>+</sup> Т-клеток, содержание субпопуляции CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> FOXP3–положительных Трег клеток повышено и составляет от 5 до 15 % от популяции CD4<sup>+</sup> Т-клеток, представленных в инфильтрате. Процент данной субпопуляции выше в опухолевой ткани, чем в периферической крови. Эти регуляторные Т-клетки подавляют активность других иммунных клеток в микроокружении с помощью механизмов, которые могут быть зависимы как от межклеточных контактов, так и от продукции ингибирующих цитокинов или аденозина [31]. Недавно была обнаружена субпопуляция CD4<sup>+</sup> Т-клеток, представленная активными провоспалительными продуцирующими ИЛ-17 клетками Тх17 у больных раком яичника. Наличие указанных клеток значимым образом коррелировало с повышенным уровнем выживаемости среди этой группы больных, а также наблюдалась обратная корреляция с количеством FOXP3<sup>+</sup> Трег клеток [28].

#### **Опухоль-ассоциированные макрофаги**

Присутствующие в опухолевой ткани макрофаги (CD14<sup>+</sup>) называют опухоль-ассоциированными макрофагами (ОАМ/ТАМ). Нормальные макрофаги захватывают антигены и играют важную роль в контроле распространения инфекций, а популяция ОАМ проходит перепрограммирование, что ведет к подавлению функций иммунных клеток через высвобождение ингибирующих цитокинов, таких как ИЛ-10, PGE<sub>2</sub> или активных (ROS) форм кислорода [33]. Предполагается, что перепрограммирование ОАМ происходит в среде опухолевого микроокружения в результате индуцированной опухолью активации. Опубликованные к настоящему времени результаты указывают на активную роль ОАМ в индуцированной опухолью иммунносупрессии, с одной стороны, и стимулировании опухолевого роста – с другой. Более того, судя по предварительным результатам, предполагается, что

соответствующая дифференцировка Трег и Тх17 из неспециализированных предшественников CD4<sup>+</sup> по пути либо супрессивному, либо провоспалительному, соответственно, определяется влиянием ОАМ [28]. Таким образом, оказывается, что ОАМ вносят значительный вклад в формирование опухолевого микроокружения.

#### **Миелоидные супрессорные клетки**

В опухолевой ткани обнаружена аккумуляция так называемых миелоидных супрессорных клеток (MDSC – myeloid-derived suppressor cells), представляющих субпопуляцию производных миелоидных клеток, соответствующих мышинным клеткам CD11b<sup>+</sup>/Gr1<sup>+</sup>, с фенотипом CD34<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> CD13<sup>+</sup> CD15<sup>-</sup> [30]. Они рекрутируются из костного мозга под влиянием растворимых факторов, продуцируемых опухолью – ГМ-КСФ, VEGF и ИЛ-10; мигрируют в лимфатические узлы, где происходит перекрестное примирование дендритными клетками Т-клеток, и принимают участие в этом процессе. Они также мигрируют в опухоль, становятся опухоль-ассоциированными MDSC и ингибируют функции иммунных клеток, продуцируя аргиназу 1 (фермент, участвующий в метаболизме L-аргинина). Синергичная активность аргиназы 1 и индуцируемой синтазы окиси азота (iNOS) ведет к увеличению продукции супероксида и окиси азота. При этом подавлена реакция лимфоцитов вследствие стимулирования активности iNOS в окружающих клетках [36]. В настоящее время представлены результаты, подтверждающие активную роль MDSC в индуцированной опухолью иммунной супрессии, которая сказывается на нарушении функциональной активности иммунных клеток в опухолевой ткани, а также в периферической крови онкологических больных.

#### **Дендритные клетки**

Дендритные клетки (HLA-DR<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>) – профессиональные естественные антиген-презентирующие клетки. ДК являются обычным компонентом популяции опухоль-инфильтрирующих иммунокомпетентных клеток и отвечают за захват, процессинг и перекрестное представление ОАА наивным Т-лимфоцитам или Т-клеткам памяти, осуществляя таким образом решающую функцию в генерации опухоль-специфических эффекторных Т-клеток [12]. Кроме того, ДК влияют на индукцию Трег клеток. У онкологических больных межклеточные взаимодействия между антиген-презентирующими ДК и Т-клетками ведут к увеличению количества и накоплению Трег в области опухолевого очага и периферической крови [12].

Сигналы от ДК, определяющие результат взаимодействия ДК и Т-клеток, могут оказывать воздействие на различных уровнях:

- а. презентации антигена (сигнал 1);
- б. экспрессии ко-стимулирующих молекул (сигнал 2);
- в. иммуномодулирующих цитокинов (сигнал 3).

Стимуляция повышения экспрессии сигналов 1 и 2 при отсутствии сигнала 3 может способствовать индукции толерантности лимфоцитов в периферической крови [12]. В то же время, есть данные, указывающие, что некоторые события, относящиеся к сигналу 1, например, уровень экспрессии презентруемых антигенов, определяют какой путь будет индуцирован – по Трег или Тх2 Тэфф клеткам – независимо от статуса зрелости ДК [12]. Рассматривая АПМ ДК и учитывая, что активность некоторых из его компонентов, включая молекулы МНС II класса, может быть снижена или изменена у онкологических больных [17], можно предположить, что индукция Трег клеток может зависеть не только от уровня экспрессии антигена, но и от эффективности его процессинга и презентации Т-клеткам.

Было показано, что опухоль-ассоциированные ДК, которые находятся в непосредственном контакте с опухолевыми клетками и/или опухолевыми факторами, быстро вступают в апоптоз и у них нарушен процесс созревания. В частности, ганглиозиды (опухоль-ассоциированные молекулы) подавляют генерацию и функциональную активность ДК *in vitro* [46]. Многочисленные литературные данные о функциональных нарушениях опухоль-ассоциированных ДК позволяют высказать следующее предположение: наличие ДК в опухолевой ткани ассоциируется с более благоприятным прогнозом и большим периодом выживаемости, а также со снижением уровня рецидивирования и метастазирования [41].

#### **НК, НКТ**

НК-клетки (CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>), которые опосредуют врожденный иммунитет и содержат в цитоплазме гранулы, богатые перфорином и гранзимом, обладают хорошим потенциалом, способствующим эффективному лизису опухолевых клеток. Хорошо известно, что НК-клетки представляют «первую линию защиты» организма против воздействия патогенов [29]. Однако опухолевые клетки человека устойчивы против перфорин-опосредованного лизиса, осуществляемого НК-клетками, кроме того, среди популяции ОИЛ редко выявляются НК [57]. Более поздние данные позволяют предположить, что первичная биологическая роль НК заключается не в уничтожении мишеней – опухолевых клеток, а в участии во взаимодействии между ДК и Т-клетками и стимулировании иммунного ответа на ОАА. Поскольку опухолевое микроокружение едва ли представляет оптимальную среду для такого рода иммунного взаимодействия, малочисленность НК может объясняться их физиологическими функциями [3].

В 2000-х гг. в экспериментах на мышинных моделях с удалением специфических генов (инбредные мыши с нокаутированными генами) или субпопуляций лимфоцитов показана важная роль клеток НК и NK1.1<sup>+</sup> Т (натуральные киллерные Т-клетки, НКТ) в защите организма против вновь образующихся опухолей и метастазов. На этих мо-

делях показано, что именно клетки НК CD3<sup>+</sup> участвуют в отторжении возникающей опухоли и метастазов, когда опухолевые клетки не экспрессировали МНС-I и торможение роста опухоли не было связано с действием ИЛ-12 [2; 49].

#### **Другие иммунокомпетентные клетки**

Среди инфильтрирующих солидные опухоли человека лейкоцитов, полиморфноядерные лейкоциты встречаются не часто, за исключением скоплений эозинофилов, которые могут присутствовать в ассоциации с опухолевыми клетками. Гранулоциты также редко выявляют в опухолевой ткани человека, их замещают опухоль-ассоциированные макрофаги и MDSC, хотя часто в мышинных опухолях они представляют основной клеточный компонент. Как это может объяснить? В опухолях человека воспалительные инфильтраты представлены элементами хронического воспаления, а не остро, вследствие чего к моменту диагностирования злокачественной опухоли, анализа биопсии и обследования больного гранулоциты уже длительное время отсутствуют в области новообразования.

Иногда в опухолевой ткани (за исключением РМЖ и меланомы) можно детектировать CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> В-клетки [11]. Поскольку их первичная функция заключается в продукции антител в результате их дифференцировки в плазматические клетки, которые циркулируют в кровеносной системе, нельзя ожидать *a priori* наличие плазматических и В-клеток в опухоли, хотя возможно они и способны продуцировать антитела *in situ*, что может быть еще одним фактором защитной системы организма.

#### **Интерферон-γ**

Показано, что продуцируемый в организме интерферон-γ (ИФН-γ) проявлял защитную функцию против трансплантата опухоли, а также против образования спонтанных и индуцируемых опухолей [13]. В случае, если мышам вводили нейтрализующее ИФН-γ МКА, скорость роста трансплантационной саркомы у этих мышей значительно увеличивалась по сравнению с таковой у контрольных животных. Гиперэкспрессия доминантной негативной формы субъединицы α рецептора ИФН-γ (IFNGR1) в образцах фибросаркомы Meth A полностью отменяла чувствительность опухоли к ИФН-γ, а опухоль проявляла свойства повышенной туморогенности и ослабленной иммуногенности при сингенной трансплантации мышам инбредной линии BALB/c. Эти результаты, а также исследования последних лет [22] свидетельствуют о том, что ИФН-γ оказывает непосредственное влияние на иммуногенность опухолевых клеток и играет важную роль в процессах их распознавания и удаления.

#### **Интерфероны I типа**

Об участии в процессе противоопухолевого иммунологического надзора интерферонов I типа (ИФН-α/β), регулирующих иммунологическую ак-

тивность и стимулирующих те же биологические эффекты, что и ИФН- $\gamma$ , известно гораздо меньше.

По данным некоторых исследований предполагалось, что эндогенно секретируемый ИФН- $\alpha/\beta$  потенциально может иметь противоопухолевую активность.

Это заключение было сделано на основе экспериментов на мышах, показавших, что нейтрализация ИФН- $\alpha/\beta$  поликлональными антителами усиливала рост трансплантируемых сингенных опухолевых клеток у иммунокомпетентных животных и отменяла реакцию отторжения органов или опухолевых ксенографтов [20].

В более поздних исследованиях по изучению потенциальной роли эндогенного ИФН- $\alpha/\beta$  в процессе иммуноредактирования при трансплантации опухолевых клеток и формировании первичного опухолевого узла, секретируемый эндогенно ИФН- $\alpha/\beta$  стимулировал отторжение высоко иммуногенной сингенной мышины саркомы [15].

Интерфероны I типа представляют важное связующее звено между врожденным и приобретенным иммунитетом [5] и оказывают влияние на функциональную активность некоторых субпопуляций клеток (таких как ДК), клеток памяти CD8<sup>+</sup> T, НК – через индукцию лиганда TRAIL, участвующих в элиминации трансформированных клеток [6].

#### **Иммуноредактирование**

Развитие представлений о противоопухолевом иммунитете привело к теории «иммунного редактирования» сформулированной группой Шрейбера [14], в подтверждение которой затем стало появляться все большее количество данных [26].

В процессе постоянного возникновения трансформированных клеток иммунная система распознает аномальные клетки, которые несут отличные от нормальных клеток антигены, и уничтожает их (иммунологический надзор), при этом происходит отбор клеток, устойчивых к действию иммунной системы, которые затем дают клоны низкоиммуногенных опухолей.

Этот процесс назван иммунологическим редактированием (иммуноредактированием), которое с одной стороны отсекает трансформированные высокоиммуногенные клетки и вследствие этого с другой позволяет развиваться селективным клонам неиммуногенных опухолевых клеток, часто – с низкой экспрессией МНС II. В результате цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) не могут выполнять свою функцию.

Эта теория частично объясняет недостаточную эффективность иммунотерапии, т.к. в результате селективного отбора иммунологического редактирования развиваются резистентные к действию иммунной системы опухоли.

Кроме того, реализация противоопухолевого потенциала иммунорегуляторного звена I типа осложнена тем, что вследствие иммунологического редактирования наблюдается низкая иммуногенность опухолей, низкая экспрессия МНС I и II и/или костимулирующих молекул, отсутствие или

низкая экспрессия опухолевых антигенов, а также гетерогенность опухолей.

Таким образом, иммунная система может либо предотвращать развитие злокачественного новообразования и разрушать уже сформировавшуюся опухоль, либо стимулировать канцерогенез, прогрессию злокачественного заболевания или метастазирование. Какой из этих процессов будет преобладать? Это зависит от равновесия между медиаторами, стимулирующими или ингибирующими опухолевый рост, которые участвуют в реализации как врожденного, так и приобретенного иммунитета.

Итак, современная концепция теории иммунного надзора предполагает, что иммунная система действительно обладает способностью распознавать и разрушать опухолевые клетки.

Однако с другой стороны этот факт может способствовать «иммунному отбору» резистентных опухолевых клонов. Гипотеза «иммунного редактирования» [14] предполагает, что, элиминируя опухолевые клетки, чувствительные к действию иммунной системы, организм редактирует процесс выживаемости опухолей, которые становятся устойчивыми против иммунокомпетентных клеток. Альтернативная теория позволяет сделать вывод: в процессе прогрессии опухоль индуцирует иммуносупрессивные механизмы, которые не допускают никакой возможности иммунного уничтожения опухоли и фактически приводят к состоянию опухоль-специфической толерантности [57].

Сначала иммунная система инициирует селекцию резистентных опухолевых клонов, а затем опухоль становится невосприимчивой к иммунному воздействию.

Основным положением теории иммунной селекции или иммунологического редактирования и иммунной супрессии является допущение, что опухоль, в которой происходят новые мутации, способна ускользнуть от воздействия иммунной системы и может как избежать действия иммунитета, так и инактивировать функционирование иммунной системы организма [24].

Однако на сегодняшний день ни одна из двух гипотез не принята окончательно. Одни авторы утверждают, что прогрессия опухоли происходит в результате генетической нестабильности. Другие считают, что главную роль играет опухоль-специфическая толерантность иммунитета, которая позволяет создавать благоприятное для опухоли тканевое микроокружение независимо от иммунной системы.

Такое противоречие в отношении роли иммунитета в развитии и прогрессии злокачественного новообразования лишь подчеркивает сложный характер взаимодействий между опухолевыми и иммунными клетками.

Это также предполагает, что взаимодействия могут происходить в обоих направлениях, подвержены влиянию микроокружения, и нередко могут приводить к гибели иммунокомпетентных клеток, а не опухолевых.

### Заключение

Механизм и действующие звенья противоопухолевого иммунного ответа организма, а также причины, по которым иммунной системе не удается сдерживать опухолевый рост и образование метастазов, интенсивно обсуждаются в научной литературе в течение десятков лет. Для клинической практики особенно важна большая определенность по последней проблеме, поскольку именно этот аспект иммунологии злокачественного заболевания напрямую влияет на результат противоопухолевой иммунотерапии. Представленные многими авторами [1; 7; 21; 34; 37; 50; 52] данные о том, что опухоль вооружена множеством высокоэффективных механизмов для противодействия иммунной системе организма, позволяют использовать новые терапевтические стратегии, чтобы не допустить

ускользание опухоли от иммунного воздействия [47]. Если механизмы, которые помогают опухоли защититься от действия иммунитета, на самом деле ответственны за опухолевую прогрессию, можно предположить, что небольшие успехи современной противоопухолевой иммунотерапии могут быть значительно оптимизированы благодаря новым подходам, которые направлены против механизмов ускользания опухоли от иммунного воздействия. Поскольку эти механизмы могут быть скорее уникальны (специфичны) для каждой опухоли, а не общие для всех злокачественных новообразований, задачей будущего станет определение «иммунологического портрета» каждой опухоли и использование определенной выборочно назначаемой терапии для инактивации опухолевых защитных механизмов и восстановления активного противоопухолевого иммунитета.

### Литература.

1. Барышников, А.Ю. Взаимоотношение опухоли и иммунной системы организма // Практическая онкология. – 2003. – Т.4, №3. – С.127–30.
2. Кадагидзе З.Г. НКТ-клетки и противоопухолевый эффект // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т.10, №3. – С. 9–15.
3. Шубина И.Ж., Чикилева И.О., Михайлова И.Н. и др. Активированные натуральные киллеры в клеточной иммунотерапии // Российский иммунологический журнал. – 2012. – Т. 6(15), № 1. – С. 71–9.
4. Alshaker H.A., Matalka K.Z. IFN- $\gamma$ , IL-17 and TGF- $\beta$  involvement in shaping the tumor microenvironment: The significance of modulating such cytokines in treating malignant solid tumors // Cancer Cell Int. – 2011. – 23(11). – P. 33–44.
5. Asselin-Paturel C., Trinchieri G. Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond // J Exp Med. – 2005. – 202. – P. 461–5.
6. Booy S., Hofland L., van Eijck C. Potentials of interferon therapy in the treatment of pancreatic cancer // J Interferon Cytokine Res. – 2015. – 35(5). – P. 327–339.
7. Boyton R.J., Altmann D.M. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease // Clinical and Experimental Immunology. – 2007. – 149. – P. 1–8.
8. Burnet M. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications // Br Med J. – 1957. – №1(5023). – P.841–7.
9. Camus M., Tosolini M., Mlecnik B. et al. Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence //Cancer Res. – 2009. – 69. – P. 2685–93.
10. Cheever M., Allison J.P., Ferris A.S. et al. The prioritization of cancer antigens: a National Cancer Institute pilot project for the acceleration of translational research //Clin Cancer Res. – 2009. – 15. – P. 5323–37.
11. Coronella J.A., Spier C., Welch M. et al. Antigen driven oligoclonal expansion of tumor-infiltrating B cells in infiltrating ductal carcinoma of the breast //J Immunol. – 2002. – 169. – P. 1829–36.
12. Diebold S.S. Determination of T-cell fate by dendritic cells // Immunol Cell Biol. – 2008. – 86. – P. 389–97.
13. Dighe A.S., Richards E., Old L.J., Schreiber R.D. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors //Immunity. – 1994. – №1. – P. 447–56.
14. Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H. et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape //Nat Immunol. – 2002. – №3. – P. 991–8.
15. Dunn G.P., Koebel C.M., Schreiber R.D. Interferons, immunity and cancer immunoediting // Nat Rev Immunol. – 2006. – 6. – P. 836–48.
16. Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung //Ned Tijdschr Geneesk. – 1909. – №5. – P. 273–90.
17. Ferris R.L., Whiteside T.L., Ferrone S. Immune escape associated with functional defects in antigen processing machinery in head and neck cancer //Clin Cancer Res. – 2006. – № 12. – P. 3890–5.
18. Ferrone S., Whiteside T.L. Tumor microenvironment and immune escape //Surg Oncol Clin North Am. – 2007. – № 16. – P. 755–74.
19. Finn O.J., Binder R.J., Brickner A.G. et al. Human tumor antigens as targets of immunosurveillance and candidates for cancer vaccines. In: Gires O, Seliger B., editors. Tumor-associated antigens: identification, characterization, and clinical applications. Weinheim (Germany): Wiley-VCH, 2009. – P. 23–43.

20. Gresser I., Maury C., Vignaux F. et al. Antibody to mouse interferon alpha/beta abrogates resistance to the multiplication of Friend erythroleukemia cells in the livers of allogeneic mice // *J Exp Med.* – 1988. – 168. – P. 1271–91.
21. Gumperz J.E. CD1d-restricted “NKT” cells and myeloid IL-12 production: an immunological crossroads leading to promotion or suppression of effective anti-tumor immune responses? // *Journal of Leukocyte Biology.* – 2004. – 76. – P. 307–14.
22. Hailemichael Y., Overwijk W.W. Cancer vaccines: Trafficking of tumor-specific T cells to tumor after therapeutic vaccination // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2014. – 53. – P. 46–50.
23. Jager E., Karbach J., Gnjjatic S. et al. Recombinant vaccinia/fowlpox NY-ESO-1 vaccines induce both humoral and cellular NYESO-1-specific immune responses in cancer patients // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2006. – 103. – P. 14453–8.
24. Jewett A., Tseng H.C. Tumor induced inactivation of natural killer cell cytotoxic function; implication in growth, expansion and differentiation of cancer stem cells // *J Cancer.* – 2011. – №2. – P. 443–57.
25. June C.H. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic // *J Clin Invest.* – 2007. – 117. – P. 1466–76.
26. Kim R., Emi M., Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape // *Immunology.* – 2007. – 1. – P. 1–14.
27. Klein G. Tumor antigens // *annu rev microbiol.* – 1966. – 20. – P. 223–52.
28. Kryczek I., Banerjee M., Cheng P. et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor microenvironment // *Blood.* – 2009. – 114. – P. 1141–9.
29. Lanier L.L. Natural killer cell receptor signaling // *Curr Opin Immunol.* – 2003. – 15. – P. 308–14.
30. Luszczynski W., Krawczuk-Rybak M., Stasiak-Barmuta A. Myeloid-derived suppressor cells – the new mechanism of immunosuppression in cancer // *Postepy Hig Med Dosw.* – 2008. – 21(62). – P. 18–22.
31. Mandapathil M., Szczepanski M.J., Szajnik M. et al. Increased ectonucleotidase expression and activity in Treg of patients with head and neck cancer // *Clin Cancer Res.* – 2009. – 15. – P. 6348–57.
32. Manjili M.H. Revisiting cancer immunoediting by understanding cancer immune complexity // *J Pathol.* – 2011. – 224(1). – P. 5–9.
33. Martinez O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization // *Front Biosci.* – 2008. – 13. – P. 453–61.
34. Obeid M., Panaretakis T., Tesniere A. et al. Leveraging the Immune System during Chemotherapy: Moving Calreticulin to the Cell Surface Converts Apoptotic Death from “Silent” to Immunogenic // *Cancer Res.* – 2007. – 67(17). – P. 7941–5.
35. Oble D.A., Loewe R., Yu P., Mihm M.C. Jr. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma // *Cancer Immun.* – 2009. – 9. – P. 3–23.
36. Ochoa A.C., Zea A.H., Hernandez C., Rodri'guez P.C. Arginase, prostaglandins, and myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma // *Clin Cancer Res.* – 2007. – 13. – P. 721–6s.
37. Onji M., Akbar Sk.Md. On dendritic cell-based therapy for cancers // *J Zhejiang Univ SCI.* – 2005. – 6B(1). – P. 1–3.
38. Parmiani G., De Filippo A., Novellino L., Castelli C. Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials // *J Immunol.* – 2007. – 178. – P. 1975–9.
39. Pellegrini M., Mak T.W., Ohashi P.S. Fighting cancers from within: augmenting tumor immunity with cytokine therapy // *Trends Pharmacol Sci.* – 2010. – 31(8). – P. 356–63.
40. Provinciali M. Immunosenescence and cancer vaccines // *Cancer Immunol Immunother.* – 2009. – 58. – P. 1959–67.
41. Reichert T.E., Strauss L., Wagner E.M. et al. Signaling abnormalities and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma // *Clin Cancer Res.* – 2002. – № 8. – P. 3137–45.
42. Romero P., Cerottini J.C., Speiser D.E. The human T cell response to melanoma antigens // *Adv Immunol.* – 2006. – 92. – P. 187–224.
43. Schmieder A., Michel J., Schynhaar K. et al. Differentiation and gene expression profile of tumor-associated macrophages // *Semin Cancer Biol.* – 2012. – 22(4). – P. 289–97.
44. Seliger B., Quandt D. The expression, function, and clinical relevance of B7 family members in cancer // *Cancer Immunol Immunother.* – 2012. – 61(8). – P. 1327–41.
45. Sethi G., Shanmugam M.K., Ramachandran L. et al. Multifaceted link between cancer and inflammation // *Biosci Rep.* – 2012. – 32(1). – P. 1–15.
46. Shurin G.V., Shurin M.R., Bykovskaja S. et al. Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function // *Cancer Res.* – 2001. – 61. – P. 363–9.
47. Slavin S.A., Ackerstein R. Or, Shapira M.Y. et al. Immunotherapy in high-risk chemotherapy-resistant patients with metastatic solid tumors and hematological malignancies using intentionally mismatched donor lymphocytes activated with rIL-2: a phase I study // *Cancer Immunol Immunother.* – 2010. – 59. – P. 1511–9.
48. Smyth M.J., Dunn G.P., Schreiber R.D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity // *Adv Immunol.* – 2006. – 90. – P. 1–50.

49. *Smyth M.J., Thia K.Y., Street S.E. et al.* Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells // *J Exp Med.* – 2000. – 191. – P. 661–8.
50. *Storkus W.J., Falo Jr L.D.* A ‘good death’ for tumor immunology // *Nature Medicine.* – 2007. – 13(1). – P. 28–31.
51. *Strauss L., Bergmann C., Szczepanski M. et al.* A unique subset of CD4/CD25<sup>high</sup>/FOXP3 T cells secreting IL-10 and TGF $\beta$ 1 mediates suppression in the tumor microenvironment // *Clin Cancer Res.* – 2007. – 13. – P. 4345–54.
52. *Tan G.X., Zhang H., Feng H. et al.* The Therapeutic Effect of Cytokine-Induced Killer Cells on Pancreatic Cancer Enhanced by Dendritic Cells Pulsed with K-RasMutant Peptide // *Clinical and Developmental Immunology.* – 2011. – 1. – P. 1–9.
53. *Thakur A., Littrup P., Paul E.N. et al.* Induction of specific cellular and humoral responses against renal cell carcinoma after combination therapy with cryoablation and granulocyte-macrophage colony stimulating factor: a pilot study // *J Immunother.* – 2011. – 34(5). – P. 457–467.
54. *Turcotte S., Rosenberg S.A.* Immunotherapy for metastatic solid cancers // *Adv Surg.* – 2011. – 45. – P. 341–60.
55. *Vendramini-Costa D.B., Carvalho J.E.* Molecular link mechanisms between inflammation and cancer // *Curr Pharm Des.* – 2012. – 18(26). – P. 3831–52.
56. *Whiteside T.L.* Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic interventions // *Semin Cancer Biol.* – 2006. – 16. – P. 3–15.
57. *Whiteside T.L.* The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth // *Oncogene.* – 2008. – 27. – P. 5904–12.
58. *Yang S., Gattinoni L., Liu F. et al.* In vitro generated anti-tumor T lymphocytes exhibit distinct subsets mimicking in vivo antigen-experienced cells // *Cancer Immunol Immunother.* – 2011. – 60(5). – P. 739–49.

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 616-006-097:577.112.82:543.54

Ю.П. Финашутина<sup>1</sup>, А.В. Мисюрин<sup>1,2</sup>, Т.В. Ахлынина<sup>1</sup>, Н.А. Лыжко<sup>1</sup>, А.А. Крутов<sup>2</sup>,  
Е.В. Аксенова<sup>2</sup>, В.А. Мисюрин<sup>1</sup>, А.Ю. Барышников<sup>1</sup>

**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНОГО БЕЛКА PRAME И МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К НЕМУ**

<sup>1</sup>ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, Москва

<sup>2</sup>ООО «ГеноТехнология», Москва

**Контактная информация**

Финашутина Юлия Павловна, научный сотрудник лаборатории рекомбинантных опухолевых антигенов НИИ ЭДнТО

адрес: 115478 Москва, Каширское шоссе, д. 24; тел. +7(499) 612-80-38

e-mail: [j\\_finashutina@mail.ru](mailto:j_finashutina@mail.ru)

Статья поступила 23.04.2015, принята к печати 10.06.2015.

**Резюме**

В последние годы среди опухолевых антигенов, распознаваемых цитотоксическими Т-лимфоцитами, найдено много перспективных объектов для создания противоопухолевых вакцин. Известно например, что антигены белка PRAME гиперэкспрессированы на поверхности опухолевых клеток различного гистологического происхождения, в том числе – при острых и хронических лейкозах. После инсерции вектора, сконструированного на базе κДНК гена PRAME, в бактерию можно синтезировать рекомбинантный белок PRAME. Нами были разработаны продуценты для экспрессии в виде телец включения полноразмерного белка PRAME и его N-концевой половины. Кроме того, отработан метод выделения, очистки в растворимой форме белка PRAME. Чистота полученного белка оценивается в 95–96%. N-концевая половина белка использовалась для наработки анти-PRAME антител, которые в дальнейшем использовали при вестерн-блоттинге различных линий опухолевых клеток. Данные антитела специфически распознавали нативный PRAME как в клеточных линиях, так и в образцах опухоли, полученных от онкологических больных. Наши данные подтверждают предположение, что рекомбинантный антиген может использоваться в качестве мишени для диагностических и терапевтических подходов. Полученные моноклональные антитела можно применять для иммуногистохимических исследований образцов опухолевых клеток онкогематологических больных и контролировать опухолевый рост.

**Ключевые слова:** рекомбинантный антиген, PRAME, аффинная хроматография, рефолдинг, моноклональные антитела.

Yu.P. Finashutina<sup>1</sup>, A.V. Misyurin<sup>1,2</sup>, T.V. Akhlynina<sup>1</sup>, N.A. Lyzhko<sup>1</sup>, A.A. Krutov<sup>2</sup>,  
E.V. Aksenova<sup>2</sup>, V.A. Misyurin<sup>1</sup>, A.Yu. Baryshnikov<sup>1</sup>

**PRODUCTION OF PURIFIED HUMAN RECOMBINANT ANTIGEN PRAME AND SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES**

<sup>1</sup>FSBI «N.N. Blokhin RCRC», Moscow

<sup>2</sup>«GeneTechnology» LLC, Moscow

**Abstract**

Tumor antigens recognized by CTLs have been identified several years ago and are major targets for creating anticancer vaccines. PRAME is an antigen which is highly expressed in various malignant tumors including melanomas and hematopoietic malignancies such as acute and chronic leukemias (AML, CML). Technology for producing recombinant antigen PRAME is based on creating a bacterial producer strain containing cDNA of human PRAME gene. We have obtained two producers of recombinant PRAME protein and its N-half, the synthesis of the target protein in the producers occurs in the inclusion bodies. The schemes of isolation and purification of soluble proteins have been developed. The protein purity was approximately 95–96%. The monoclonal antibodies raised against truncated recombinant PRAME were used for PRAME protein analysis by Western blot on the various tumor cells. Specific monoclonal antibodies recognized the native PRAME protein in tumor cell lines as well as in tumor samples from patients. Our findings support the suggestion that this recombinant antigen may be further used as a target for diagnostic and therapeutic approaches. The monoclonal antibodies can be used for immunoassays of tumor samples from patients with hematologic malignancies to reveal clinical features and to monitor tumor progression.

**Key words:** recombinant PRAME antigen, affine chromatography, refolding, monoclonal antibodies.

## Введение

Значительный объем информации о распространенности и свойствах опухолеассоциированных антигенов человека, накопленный за последние десятилетия, создает предпосылку к проведению активной специфической иммунотерапии рака [1; 9–18; 23; 27; 30; 32; 37; 38]. Идентификация опухолевых антигенов, способных вызывать иммунный ответ у онкологических больных и разработка иммуногенных вакцин против рака на основе этих антигенов, представляет собой сложную и актуальную задачу [2–8; 19–22].

РТА обнаруживают только в немногих здоровых тканях (семенники, яичники, эндометрий), а также в ряде опухолевых тканей различного гистологического происхождения. Пептиды многих белков этого семейства презентуются на поверхности опухолевых клеток, стимулируя наработку антиген-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов, и этот факт делает их кандидатами для создания на их основе противоопухолевых вакцин. С использованием пептидов и рекомбинантных белков семейства РТА уже создан ряд вакцин, используемых в протоколах лечения меланомы, немелкоклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы [34; 40; 47]. Вакцины на основе пептидов имеют ряд преимуществ, но не лишены недостатков: не являются универсальными, так как функционально связаны только с одним типом молекулы HLA; чистые пептиды слабо иммуногенны и могут стимулировать развитие иммунологической толерантности [25].

Антиген PRAME относится к семейству РТА и впервые был обнаружен в связи с тем, что пептиды этого белка распознавались цитотоксическими Т-лимфоцитами у больного меланомой [33]. PRAME также вызывает иммунный ответ у пациентов с хроническим миелоидным лейкозом, и острыми лимфоидными и миелоидными лейкозами [42; 43]. Экспрессия гена *PRAME* обнаруживается на низком уровне в тканях семенников и, на очень низком уровне, в яичниках, плаценте и почке [36]. Достаточно высокий уровень экспрессии *PRAME* показан для широкого спектра солидных опухолей и онкогематологических заболеваний [10; 27; 39; 44]. Т-клеточный иммунный ответ активируется также при вакцинации пациентов пептидами PRAME [24]. Вакцины на их основе проходят начальную фазу клинических испытаний для терапии рака простаты, почек, меланомы и хронического лимфолейкоза [45; 48].

Следует заметить, что белок PRAME в клетке локализован в различных компартментах, в том числе – во внешней мембране [41]. Белки, локализованные подобным образом, отличаются невысокой стабильностью растворимой формы. Для сохранения белка в удобной для проведения экспериментов форме требуется подбирать специальные условия очистки.

В настоящей работе мы получили очищенный рекомбинантный белок PRAME, наработанный

в системе гетерологической экспрессии в клетках *E. coli*, и оптимизировали условия для его очистки и рефолдинга. Белок может быть использован как антиген для противоопухолевой иммунотерапии.

Нами также получены МКА к антигену PRAME, которые можно применять для выявления экспрессии этого белка в опухолевых клетках. Использование этих антител дополнит предварительный отбор пациентов для иммунотерапии.

## Материалы и методы

### Бактериальные штаммы и клеточные линии

Использовались штаммы *E. coli* DH-5 $\alpha$ , BL21(DE3)pLyS и B834 (DE3)pLyS (Novagen, USA), а также линия эритромиелоидного лейкоза K562, линия меланомы Mel Hn и легочные фибробласты WI-38 человека.

### Получение кодирующей последовательности гена PRAME

Копию гена *PRAME* и его фрагмента получали с помощью ПЦР.

В качестве матрицы для ПЦР использовали кДНК, полученную в результате реакции обратной транскрипции (ОТ) из тотальной РНК линии клеток K562.

Экспрессию гена в линиях клеток и клетках периферической крови пациентов определяли с помощью *real time* ПЦР.

### Получение рекомбинантных плазмид

Для создания экспрессионных векторов фрагмент ДНК, очищенный после ПЦР, обработали ферментами рестрикции BamH I и NdeI (Fermentas, Литва) и вставили по сайтам рестрикции BamH I и NdeI в плазмиду pET-15b (Novagen, США). Полученный вектор назвали pPRAME-F.

Для создания экспрессионного вектора pPRAME-N с последовательностью гена *PRAME*, кодирующую N-половину белка, первый ПЦР-продукт размером 1548 п.н. клонировали в промежуточный вектор pGEM-T-Easy (Promega, США), получая вектор pG-PRAME. Затем этот вектор обрабатывали ферментами рестрикции BamH I и EcoRV.

Большой из получившихся 2 фрагментов обрабатывали ДНК-полимеразой «Фрагмент Кленова» (Sibenzyme, Россия), затем проводили реакцию лигирования, получая вектор pG-PRAME-N. Его, вектор, обработали эндонуклеазами рестрикции BamH I и NdeI и меньший из двух получившихся фрагментов вставили в плазмиду pET-15b, получая вектор pPRAME-N.

Кроме того, был создан вектор для экспрессии белка в эукариотических клетках. Для этого кодирующая последовательность гена PRAME была клонирована в плазмиду pCEP4 (Invitrogen, США). Трансфекцию фибробластов проводили согласно инструкции производителя TransFast Transfection Reagent (Promega, USA)

### **Экспрессия рекомбинантного белка PRAME и его фрагмента**

Штаммы BL21(DE3)pLyS и B834 (DE3)pLyS были трансформированы плазмидами pPRAME-F и pPRAME-N. Трансформированные клетки высевали на чашку Петри с ампициллином (100 мкг/мл) и хлорамфениколом (34 мкг/мл) и инкубировали при +37 °С в течение ночи. Затем несколько колоний вносили в свежую среду SOB или TB и подращивали при +28 °С до плотности OD<sub>600</sub>=0,8, после чего вносили ИПТГ для индукции синтеза белка. Растили 18 ч для синтеза PRAME-F или 2–3 часа для индукции синтеза PRAME-N при +28 °С. Центрифугировали культуру при 5 000 об/мин в течение 20 мин, осадок сохраняли. Наличие целевого белка подтверждали с помощью денатурирующего электрофореза в 10–15 %-ном полиакриламидном геле по стандартной методике [35].

### **Выделение и очистка белка PRAME и фрагмента**

Осадок клеток ресуспендировали в буфере (50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 20 мМ ЭДТА). Клетки подвергали двукратному замораживанию – оттаиванию. После этого клетки подвергали ультразвуковой дезинтеграции (22 кГц, 3×10 с), добавляли рибонуклеазу до концентрации 2 ед./мл и дезоксирибонуклеазу до концентрации 300 000 ед./мл и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре.

Фрагменты разрушенных клеток осаждали центрифугированием (100 000 g, +4 °С, 1 ч). Далее проводили процедуру отмывки телец включения. Для этого осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 20 мМ трис-НСl, рН 8,0, 2 мМ ЭДТА, 0,05 М NaCl, 2 % Твин-20, и подвергали действию ультразвука, как описано выше, с последующим центрифугированием (10 000 об/мин, 5 мин). Процедуру отмывки телец включения повторяли. Полученный препарат телец включения гибридного белка был солиubilизирован в буфере, содержащем 10 мМ трис-НСl, 50 мМ имидазола, 6 М гуанидинхлорид для культуры, трансформированной плазмидой pPRAME-F, или в буфере, содержащем 10 мМ трис-НСl, 50 мМ имидазола, 8 М мочевины для культуры, трансформированной плазмидой pPRAME-N. Полученную суспензию центрифугировали 10 000 об/мин 5 мин, и супернатант использовали для дальнейшей очистки.

Далее проводили металл-хелатную аффинную хроматографию при умеренном давлении (FPLC, «Pharmacia», США) на колонке с Ni<sup>2+</sup> агарозой (GE Healthcare, Великобритания). Для очистки белка PRAME-F колонку уравнивали буфером (10 мМ трис-НСl, 50 мМ имидазол, 6 М гуанидинхлорид), наносили препарат, промывали колонку тем же буфером, содержащим 2 % Твин-20, и проводили элюцию буфером (10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 250 мМ имидазол, 6 М мочевины). Фракции анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

Ренатурацию целевого белка проводили 10-кратным разведением в буфере, содержащем 10 % глицерина, 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 0,1 мМ ЭДТА, 0,05 М NaCl, 0,1 мМ ТСЕР, 5 % N-лауроил саркозил при +4 °С с последовательным диализом препарата против аналогичного буфера. Затем белок концентрировали в ячейках Amicon-30 (Millipore, Германия), уменьшая объем препарата в 10 раз. Окончательный рефолдинг проводили с помощью диализа против буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl, рН 7,5; 0,07 % N-лауроил саркозила при 4 °С, затем диализ повторяли дважды против буфера, содержащего 150 мМ NaCl, 0,07 % N-лауроил саркозила при 4 °С. Состав буферов для рефолдинга белков подбирали с помощью наборов iFOLD Protein refolding System 1 и 2 (Novagen, США).

Для очистки белка PRAME-N колонку уравнивали буфером (10 мМ трис-НСl, 50 мМ имидазол, 8 М мочевины), наносили препарат, промывали колонку тем же буфером, содержащим 2 % Твин-20, и проводили элюцию буфером (10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 300 мМ имидазол, 6 М мочевины). Содержащие целевой белок фракции объединяли и диализовали против буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl, рН 7,5; 0,07 % N-лауроил саркозила при +4 °С, затем диализ повторяли дважды против избытка буфера, содержащего 150 мМ NaCl; 0,07 % N-лауроил саркозила при +4 °С. Раствор, содержащий очищенные рекомбинантные белки, стерилизовали фильтрацией через фильтр 0,22 мкм.

### **Получение МКА к белку PRAME**

Мышей линии Balb/c иммунизировали трехкратно с двухнедельными интервалами очищенным белком PRAME в дозе 50 мкг/мышь.

Слияние клеток селезенки мышей с миеломными клетками и последующее субклонирование гибридом проводили согласно стандартным методикам [31].

Последующий отбор гибридомных клонов проводили с помощью твердофазного иммуноферментного анализа согласно стандартным методикам, используя белок PRAME в качестве антигена.

Дополнительный отбор гибридом, секретирующих антитела, проводили методом вестерн-блоттинга, используя линию клеток K562 с высоким уровнем экспрессии PRAME.

В дальнейшем МКА получали из асцитной жидкости мышей, имеющих в брюшной полости клетки соответственной гибридомы; при этом иммуноглобулиновую фракцию получали с помощью аффинной хроматографии на G-сефарозе (GE Healthcare, Великобритания). Изотип антител определяли с помощью набора для изотипирования иммуноглобулинов мыши (Sigma, США).

### **Иммуноблоттинг**

Экспрессию белка определяли в лизатах клеточных линий K562, линии меланомы Mel Hn, фибробластах человека WI-38 и мононуклеарных клетках периферической крови. Лизаты готовили с помощью RIPA-буфера с ингибиторами протеаз

(Thermo Scientific Pierce, США). Электрофорез в 10 %-ном полиакриламидном геле проводили по стандартной методике Laemmli [35]. После электрофореза перенос белков из геля на Amersham Hybond-P PVDF мембрану (GE Healthcare, Великобритания) осуществляли методом полусухого электроблоттинга. В качестве первичных антител использовали полученные в данной работе МКА к белку PRAME; вторичных – антитела козы против антител мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Immune Jackson Research, США).

Для визуализации белка, связавшегося с антителами, использовали двухкомпонентную ECL<sup>TM</sup> Western Blotting систему (GE Healthcare, Великобритания). Цитоплазматическая фракция белков клеток меланомы и фракция, содержащая ядерные белки, получены с помощью набора для фракционирования клеток (BioVision, США).

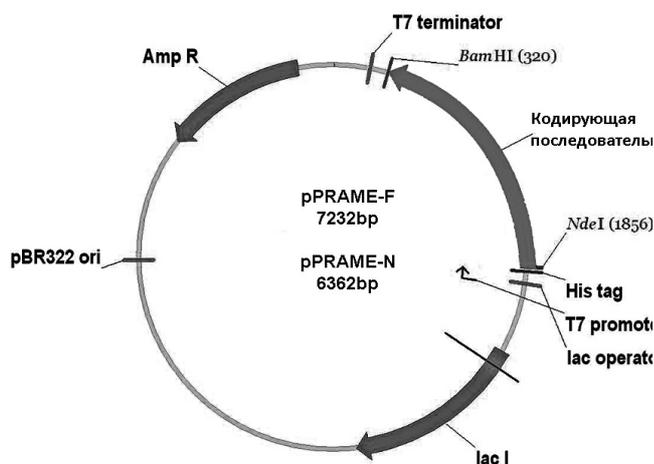
#### Иммунизация животных рекомбинантными белками

Две группы по 20 мышей линии DBA/2 были трижды иммунизированы подкожно с двухнедельными интервалами очищенными белками PRAME-F и PRAME-N в дозе 100 мкг/мышь с 30 мкг гидроксида алюминия в качестве адьюванта. Титр антител в сыворотке оценивался методом твердофазного иммуноферментного анализа через 6 нед после первой иммунизации.

#### Результаты

##### Создание экспрессирующих конструкций

Для получения рекомбинантных белков созданы плазмидные конструкции на основе вектора pET-15b, содержащие кодирующие последовательности и последовательность для 6 гистидиновых аминокислотных остатков (6xHis-tag). Принципиальная схема плазмид представлена на рис. 1.



**Рис.1.** Схема векторов для экспрессии PRAME в бактериальной системе.

Все экспрессирующие конструкции охарактеризованы прямым секвенированием. Составные части плазмид и последовательности, кодирующие

белок PRAME полностью соответствуют оригинальной схеме конструирования плазмиды.

Полноразмерный ген PRAME (NM\_006115.4) клонирован в вектор pET-15b для бактериальной экспрессии под индуцируемый T7-промотор и в вектор pCER4 для экспрессии в эукариотических клетках под контролем CMV-промотора. Подобным образом на основе вектора pET-15b сконструирована плаزمида для экспрессии N-половины белка PRAME.

#### Оптимизация процесса культивирования клеток штамма-продуцента рекомбинантных белков

Проведена оптимизация экспрессии рекомбинантных белков в клетках *E. coli*, при этом изменяли следующие параметры:

- штамм-продуцент (BL21(DE3)pLyS и B834 (DE3)pLyS),
- время индукции (2 ч и 18 ч),
- концентрацию ИПТГ и температуру культивирования бактерий (+28 °C; +37 °C).

Наилучший уровень экспрессии рекомбинантного белка достигнут в штамме BL21(DE3)pLyS на 18 – 20 ч после индукции 1 мМ ИПТГ при +28 °C для pPRAME-F и на 2–3 ч после индукции 0,5 мМ ИПТГ для pPRAME-N.

Оба рекомбинантных белка соответствовали ожидаемым размерам (60 и 30 кДа) и накапливались в нерастворимом состоянии.

#### Оптимизация процесса очистки рекомбинантных белков

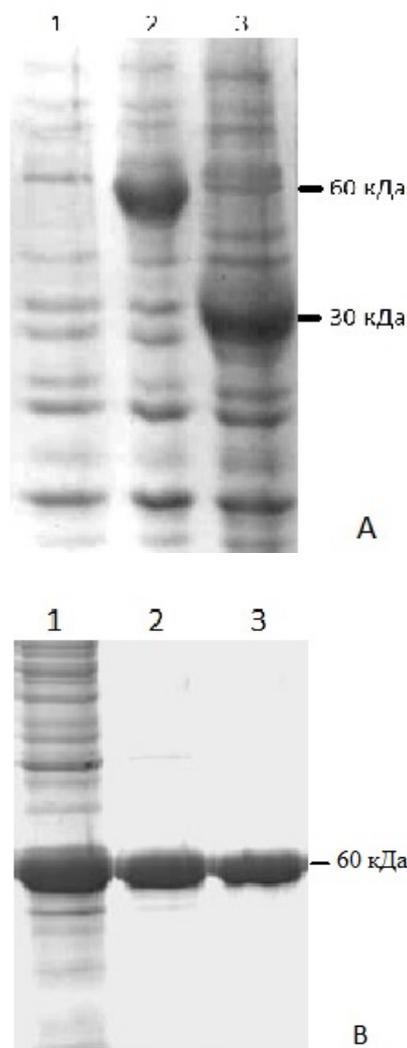
Нерастворимые тельца включения предварительно отмывали буфером, содержащим Твин-20. Затем оба рекомбинантных белка очищали в денатурирующих условиях с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии.

Для солюбилизации белка PRAME-N использовали 6 М мочевины, рефолдинг очищенного белка проводили с помощью многократного диализа. Полноразмерный белок PRAME-F при аналогичной методике после диализа выпадал в осадок, и для него условия рефолдинга подбирали, изменяя состав буфера, pH и метод ренатурации.

В итоге были подобраны условия, включающие 10-кратное разведение буфером на основе соли триса при pH 8,0, содержащим N-лауроилсаркозин. При этих условиях рефолдинга рекомбинантный белок PRAME-F оставался растворимым в достаточной для дальнейших нужд концентрации.

Уровень продукции целевого белка в штамме *E. coli*, трансформированном плазмидами pPRAME-F и pPRAME-N, составлял соответственно 12 мг и 15 мг на 1 л. исходной культуры.

Чистота рекомбинантных белков оценивалась по электрофореграмме с помощью программы Phoretix 1D Advanced v.5.10 и составляла 96 и 94 % соответственно. Примеры экспрессии и очистки белка приведены на рис. 2.



**Рис. 2.** Экспрессия и очистка рекомбинантных белков:

- A. 1 – клетки *E. coli* без индукции экспрессии; 2; 3 – клетки *E. coli*, экспрессирующие белки PRAME-F и PRAME-N соответственно.  
 B. 1 – предварительно отмытые тельца включения; 2; 3 – очищенный полноразмерный рекомбинантный белок PRAME.

#### Получение МКА к белку PRAME

При иммунизации мышей белком rPRAME-N получены 9 гибридных линий, секретирующих анти-PRAME антитела. Из них отобраны две пробы культуральных супернатантов, которые специфически узнавали белок в клеточных лизатах, что и доказано с помощью иммуноблоттинга. Проведено изотипирование МКА, согласно которому один клон принадлежит к подклассу IgG1, а другой – к IgG2a. Полученные МКА специфически распознавали очищенный рекомбинантный белок PRAME, а также белок, экспрессирующийся в различных культурах клеток.

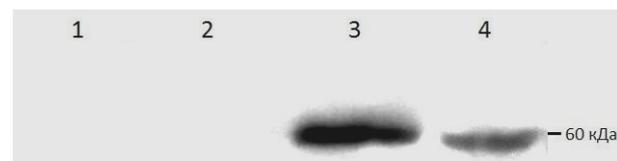
#### Экспрессия белка

##### в нормальных и опухолевых клетках

Для детекции белка в клетках с помощью полученных антител использованы клеточные линии с высоким уровнем экспрессии гена (K562, Mel

Hn), а также линия легочных фибробластов в качестве отрицательного контроля (исходно ген *PRAME* не экспрессируется). В фибробластах инициирована экспрессия гена *PRAME* с помощью введения в них вектора для экспрессии генов в эукариотических культурах.

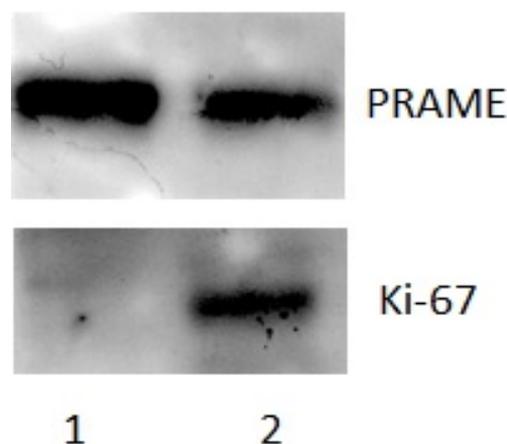
Специфический сигнал на иммуноблоте, соответствующий белку с молекулярным весом 60 кДа, обнаружен только в лизатах клеток с высоким уровнем экспрессии гена *PRAME* при использовании каждого МКА (рис. 3).



**Рис. 3.** Иммуноблот клеточных лизатов, окрашенный МКА к PRAME N8:

- 1 – фибробласты W138;  
 2 – фибробласты W138, трансфицированные контрольным вектором pCEP4;  
 3 – фибробласты W138, трансфицированные вектором pCEP4-PRAME;  
 4 – линия клеток K562.

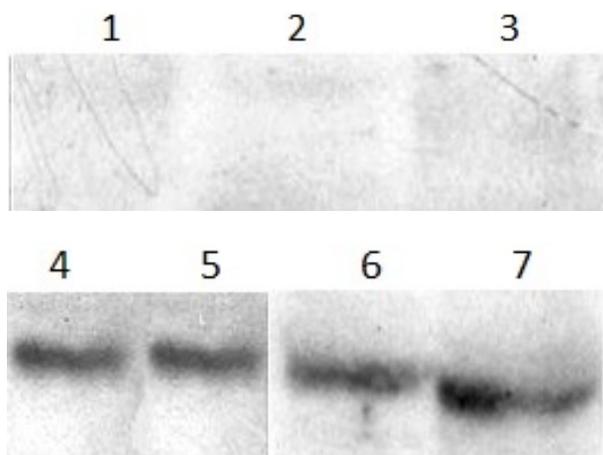
Кроме того, антиген PRAME обнаруживался как в ядерной, так и в цитоплазматической фракции клеток меланомы Mel Hn (рис. 4). По литературным данным локализация белка может быть ядерной и цитоплазматической [41; 46].



**Рис. 4.** Иммуноблот линии меланомы Mel Hn, окрашенный МКА к PRAME N8 и антителами к ядерному белку Ki-67:

- 1 – цитоплазматическая фракция клеток;  
 2 – ядерная и мембранная фракции клеток.

Кроме того, с помощью МКА исследованы клетки периферической крови онкогематологических пациентов (ХМЛ и ММ). В этом случае также наблюдалось соответствие результатов с данными по экспрессии гена. Для пациентов и здоровых доноров, отрицательных по экспрессии гена, не обнаруживался сигнал на иммуноблоте и наоборот (рис. 5).



**Рис. 5.** Пример иммуноблота клеток пациентов, окрашенный МКА к PRAME:

- 1 – здоровый донор;
- 2; 3 – клетки пациента с ХМЛ (хроническая фаза);
- 4; 5 – ХМЛ, бластный криз;
- 6; 7 – множественная миелома.

#### **Развитие гуморального ответа на рекомбинантные белки PRAME-F и PRAME-N**

Методом непрямого твердофазного ИФА были измерены титры специфических антител сыворотках мышей к полученным рекомбинантным белкам. Каждым белком было проиммунизировано 10 мышей. Для белка PRAME-F максимальный титр достигал 1 : 102 400, а для белка PRAME-N – 1 : 51 200, из чего можно сделать вывод: белок достаточно иммуногенен.

Таким образом, в данной работе были получены рекомбинантный полноразмерный антиген PRAME человека и антиген, соответствующий N-половине целого белка PRAME.

Оптимизированы условия экспрессии и очистки этих белков, в результате чего последние в растворимой форме пригодны для иммунизации и получения антител.

#### **Литература**

1. *Абраменко И.В., Белоус Н.И., Крячок И.А. и др.* Экспрессия гена PRAME при миеломной болезни // Терапевтический архив. – 2004. – Т. 76, № 7. – С. 77–81.
2. *Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Соколова З.А., Косоруков В.С.* Разработка липосомальной конструкции, содержащей лизат опухолевых клеток // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 5.
3. *Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Щербаков А.И. и др.* Разработка модели противоопухолевой липосомальной вакцины // Иммунология. – 2014. – № 6. – С. 317–21.
4. *Барышников А.Ю.* Взаимодействие опухоли и иммунной системы организма // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4, № 3. – С. 127–30.
5. *Барышников А.Ю.* Принципы и практика вакцинотерапии рака // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2004. – № 2. – С. 59–63.
6. *Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Кадагидзе З.Г. и др.* Современные проблемы биотерапии злокачественных опухолей // Вестник Московского онкологического общества. – 2008. – № 1. – С. 6–10.
7. *Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Михайлова И.Н., Петенко Н.Н.* Вакцинотерапия рака: от эксперимента к клинике // Вестник Московского Онкологического Общества. – 2007. – № 10. – С. 46–8.
8. *Барышникова М.А., Барышников А.Ю.* Молекулярные механизмы преодоления множественной лекарственной устойчивости липосомальными противоопухолевыми препаратами // Российский био-

С помощью одного из белков нами получены МКА к белку PRAME, специфически распознающие нативный белок в культурах опухолевых клеток и клетках онкогематологических больных.

Кроме того, на основании наших результатов можно предположить, что белок и/или его фрагменты расположены как в ядре клетки, так и в цитоплазме.

Это согласуется с данными литературы по исследованию локализации белка PRAME [41; 46]. Антитела, распознающие опухолевые антигены, в том числе PRAME, широко применяют в научных и клинических исследованиях [16; 26].

Однако антитела к белку PRAME, используемые в зарубежных работах – антитела поликлональные, полученные к олигопептиду [28; 46].

В некоторых работах антитела производили к 22 кДа части белка [41], однако такие антитела распознавали белок необычного размера в иммуноблотах.

#### **Заключение**

В своей работе мы получили два МКА к рекомбинантной N-половине белка PRAME. Из наблюдений по связыванию МКА с эпитопами PRAME на живых клетках мы предположили, что они обладают специфичностью к разным эпитопам белка. Это дает более широкие возможности для использования антител для исследований. Поскольку полученные белки продемонстрировали свою иммуногенность, мы считаем целесообразным продолжить исследование полученных рекомбинантных белков PRAME как антигенов для противоопухолевой иммунотерапии. При проведении экспериментов рекомендуем придерживаться условий, изложенных выше.

*Работа поддержана международным фондом INTAS (Ref.Nr. 03-55-1739)*

- терапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 1. – С. 3–10.
9. Гапонова Т.В., Менделеева Л.П., Мисюрин А.В. и др. Экспрессия опухолеассоциированных генов PRAME, WT1 и XIAP у больных множественной миеломой // Онкогематология. – 2009. – № 2. – С. 52–7.
  10. Мисюрин А.В., Абраменко И.В., Белоус Н.И. и др. Экспрессия гена PRAME при множественной миеломе // Онкология. – 2004. – Т. 2. – С. 90–4.
  11. Мисюрин В.А. Аутосомные раково-тестикулярные гены // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 77–82.
  12. Мисюрин В.А. X-хромосомные раково-тестикулярные гены // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 3–10.
  13. Мисюрин В.А., Лукина А.Е., Кесаева Л.А. и др. Различия в частоте развития рецидива острого промиелоцитарного лейкоза в зависимости от уровня экспрессии PRAME // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т. 59, № S1. – С. 51.
  14. Мисюрин В.А., Лукина А.Е., Мисюрин А.В. и др. Особенности соотношения уровней экспрессии генов PRAME и PML/RARA в дебюте острого промиелоцитарного лейкоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 9–16.
  15. Мисюрин В.А., Мисюрин А.В., Кесаева Л.А. и др. Изменение профиля экспрессии канцер-тестис антигенов в крови при прогрессии хронического миелоидного лейкоза // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т. 59, № S1. – С. 52.
  16. Мисюрин В.А., Мисюрин А.В., Кесаева Л.А. и др. Новые маркеры прогрессирования хронического миелолейкоза // Клиническая онкогематология. – 2014. – Т. 7, № 2. – С. 206–12.
  17. Мисюрин В.А., Мисюрин А.В., Кесаева Л.А. и др. Сходство профилей экспрессии раково-тестикулярных генов при хронических миелолипролиферативных заболеваниях и хроническом миелоидном лейкозе // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т. 59, № S1. – С. 51–2.
  18. Мисюрин В.А., Мисюрин А.В., Лукина А.Е. и др. Профили экспрессии раково-тестикулярных генов в клеточных линиях меланомы // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2014. – Т. 31, № 2. – С. 104–9.
  19. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Клименко О.В. и др. Разработка липосомальной формы противоопухолевой вакцины // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 62–6.
  20. Никитин К.Д., Барышников А.Ю. Противоопухолевые вакцины на основе белков теплового шока // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 3–12.
  21. Новиков В.В., Евсегнеева И.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы при социально значимых инфекциях // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 100–5.
  22. Новиков В.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. и др. Особенности структурного состояния пула растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы // Молекулярная медицина. – 2009. – № 4. – С. 27–33.
  23. Aksenova E., Krutov A., Misiurin A. et al. Correlation between PRAME, WT1 and BCR-ABL expression and response to the therapy at CML // Haematologica. – 2010. – 95(S2). – P. 529.
  24. Babiak A., Steinhauser M., Götz M. et al. Frequent T-cell responses against immunogenic targets in lung cancer patients for targeted immunotherapy // Oncol Rep. – 2014. – 31(1). – P. 384–90.
  25. Vocchia M., Bronte V., Colombo M.P. Antitumor vaccination: where we stand // Haematologica. – 2000. – 85(11). – P. 1172–206.
  26. Brenne K., Nymoer D.A., Reich R. PRAME (preferentially expressed antigen of melanoma) is a novel marker for differentiating serous carcinoma from malignant mesothelioma // Am J Clin Pathol. – 2012. – 137(2). – P. 240–7.
  27. Epping M.T., Hart A.A., Glas A.M. et al. PRAME expression and clinical outcome of breast cancer // Br J Cancer. – 2008. – 99. – P. 398–403.
  28. Epping M.T., Wang L., Edel M.J. et al. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling // Cell. – 2005. – 122. – P. 835–47.
  29. Finashutina Y., Akhlynina T., Zhelnova E. et al. Anti-tumor vaccination in combination with modified donor lymphocyte infusion for an AML resistant patient with early extramedullary relapses // Haematologica. – 2013. – 98(1). – P. 517–8.
  30. Finashutina Yu.P., Aksenova E.V., Misyurin A.V. et al. PRAME expression in chronic myeloid leukemia // Haematologica. – 2007. – 92(1). – P. 376.
  31. Galfrè G., Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures // Methods Enzymol. – 1981. – 73. – P. 3–46.
  32. Gaponova T., Mendeleeva L.P., Misiurin A. et al. Expression of tumor-associated genes in multiple myeloma patients during high-dose chemotherapy and auto-SCT // Cellular Therapy and Transplantation. – 2009. – 2(5). – P. 62–3.
  33. Ikeda H., Lethe B., Lehmann F. et al. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor // Immunity. – 1997. – 6. – P. 199–208.

34. *Kruit W.H., van Ojik H.H., Brichard V.G. et al.* Phase 1/2 study of subcutaneous and intradermal immunization with a recombinant MAGE-3 protein in patients with detectable metastatic melanoma // *Int J Cancer*. – 2005. – 117(4). – P. 596–604.
35. *Laemmli U.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – 224. – P. 680–5.
36. *Luetkens T., Schafhausen P., Uhlich F. et al.* Expression, epigenetic regulation, and humoral immunogenicity of cancer-testis antigens in chronic myeloid leukemia // *Leukemia Research*. – 2010. – 34. – P. 1647–55.
37. *Lyzhko N.A., Akhlynina T.V., Misiurin A.V. et al.* Expression and localization of the PRAME protein in the different cell cultures // 17th EHA Congress. – 2012. – Abstract 1356.
38. *Misurin A., Gaponova T., Mendeleeva L. et al.* Expression of PRAME and WT1 in multiple myeloma patients during high dose chemotherapy and auto-SCT // *Blood*. – 2008. – 112(11). – P. 5128.
39. *Oberthuer A., Hero B., Spitz R. et al.* The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome // *Clin Cancer Res*. – 2004. – 10. – P. 4307–13.
40. *Okuyama R., Aruga A., Hatori T. et al.* Immunological responses to a multi-peptide vaccine targeting cancer-testis antigens and VEGFRs in advanced pancreatic cancer patients // *Oncoimmunology*. – 2013. – 2(11). – e27010.
41. *Proto-Siqueira R., Figueiredo-Pontes L.L., Panepucci R.A. et al.* PRAME is a membrane and cytoplasmic protein aberrantly expressed in chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma // *Leukaemia Res*. – 2006. – 30. – P. 1333–9.
42. *Quintarelli C., Dotti G., De Angelis B. et al.* Cytotoxic T lymphocytes directed to the preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) target chronic myeloid leukemia // *Blood*. – 2008. – 112. – P. 1876–85.
43. *Rezvani K., Yong A.S., Tawab A. et al.* Ex vivo characterization of polyclonal memory CD8+ T-cell responses to PRAME-specific peptides in patients with acute lymphoblastic leukemia and acute and chronic myeloid leukemia // *Blood*. – 2009. – 113. – P. 2245–55.
44. *Steinbach D., Hermann J., Viehmann S. et al.* Clinical implications of PRAME gene expression in childhood acute myeloid leukemia // *Cancer Genet Cytogenet*. – 2002. – 133. – P. 118–23.
45. *Tabarkiewicz J., Giannopoulos K.* Definition of a target for immunotherapy and results of the first Peptide vaccination study in chronic lymphocytic leukemia // *Transplant Proc*. – 2010. – 42(8). – P. 3293–6.
46. *Tajeddine N., Gala J.L., Louis M. et al.* Tumor-associated antigen preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) induces caspase-independent cell death in vitro and reduces tumorigenicity in vivo // *Cancer Res*. – 2005. – 65. – P. 7348–55.
47. *Vansteenkiste J., Zielinski M., Linder A. et al.* Final results of a multi-center, double-blind, randomized, placebo-controlled phase II study to assess the efficacy of MAGE-A3 immunotherapeutic as adjuvant therapy in stage IB/II non-small cell lung cancer (NSCLC) // *J Clin Oncol*. – 2007. – 25(18S). – P. 7554.
48. *Weber J.S., Vogelzang N.J., Ernstoff M.S. et al.* A phase 1 study of a vaccine targeting preferentially expressed antigen in melanoma and prostate-specific membrane antigen in patients with advanced solid tumors // *J Immunother*. – 2011. – 34(7). – P. 556–67.

УДК 616-097:616-006-018:576.3.017.22:616-006.81:616-076.5

О.С. Бурова, Н.В. Голубцова, М.А. Барышников, М.В. Оборотова, Л.Ф. Морозова, К.А. Барышников, А.Е. Бармашов, В.И. Карасева, А.Н. Иншаков, А.С. Гриневич, И.М. Лученко, П.К. Иванов, А.Ю. Барышников

**МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ICO-401 ПРОТИВ АНТИГЕНА CD133**

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

**Контактная информация**

Бурова Ольга Семеновна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО

адрес: 115478, Москва, Каширское ш., 24; тел. +7(499)324-10-65

e-mail: [burova-55@mail.ru](mailto:burova-55@mail.ru)

Статья поступила 20.05.2015, принята к печати 10.08.2015.

**Резюме**

Получены МКА против антигена CD133 – маркера стволовых опухолевых клеток человека. Штамм ICO-401 получали путем слияния клеток мышинной миеломы NS-1 с клетками селезенки мышей линии BALB/C, предварительно трехкратно иммунизированных с интервалом в две недели клетками меланомы кожи человека линии mel IbrEE34RMCR. Слияние проведено при помощи р-ра ПЭГ/ДМСО. Для скрининга полученных МКА ICO-401 использовали клеточные линии меланомы человека из коллекции ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», различающиеся экспрессией антигена CD133. Экспрессию антигена оценивали в РИФ на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™II. МКА ICO-401 сравнивали с коммерческими МКА против антигена CD133, показано, что оба антитела распознают один и тот же антиген, но связываются с разными эпитопами.

**Ключевые слова:** моноклональные антитела, CD133, стволовые опухолевые клетки, меланома кожи человека, проточная цитометрия.

O.S. Burova, N.V. Golubtsova, M.A. Baryshnikov, M.V. Oborotova, L.F. Morozova, K.A. Baryshnikov, A.E. Barmashov, V.I. Karaseva, A.N. Inshakov, A.S. Grinevich, I.M. Luchenko, P.K. Ivanov, A.Yu. Baryshnikov

**MONOCLONAL ANTIBODIES ICO-401 AGAINST CD133 ANTIGEN**

FSBI «N.N. Blokhin RCRC», Moscow

**Abstract**

Monoclonal antibody (mAb) against CD133 antigen is a stem marker of human tumor cells. Strain ICO-401 was prepared by cell fusion of murine myeloma NS-1 cells with splenocytes of BALB/ C mice, pre-immunized three times with an interval of two weeks with the cells of human melanoma mel IbrEE34RMCR. Merging was conducted with solution PEG/DMSO. Screening of mAb ICO-401 was performed on human melanoma cell lines from FSBI «N.N. Blokhin RCRC» collection which differ in the expression of CD133 antigen. Antigen expression was evaluated in immunofluorescence reaction by flow cytometer BD FACSCanto™II. ICO-401 was compared with commercial mAb against CD133 antigen. The results indicated that both mAb recognize the same antigen, but bind to different epitops.

**Key words:** monoclonal antibodies, CD133, tumor stem cells, human skin melanoma, flow cytometry.

**Введение**

В каждом новообразовании присутствует небольшая популяция клеток, называемых стволовыми, способных инициировать опухоль [3; 6]. Эти клетки обладают способностью к самовоспроизведению и формированию дифференцированных опухолевых клеток [5]. Первоначально СКО были обнаружены при ОМЛ и ХМЛ [8; 11; 13; 15; 27; 28], а в последующем идентифицированы при многих злокачественных заболеваниях. Маркеры для СК разных нозологий различны. Так, для мезенхимальной ткани характерно наличие CD13, CD29/ITGB1, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106/VCAM-1 и отсутствие типичных гематопозитических поверхност-

ных белков CD31/PECAM-1, CD45/LCA и CD116. Для рака молочной железы, рака желудка, рака яичников, рака простаты, рака органов головы и шеи, меланомы характерно наличие CD44 на СКО [2; 12; 21; 22; 26; 30]. Кроме того, для СК рака молочной железы отмечено отсутствие общего для эпителиальных тканей поверхностного маркера CD24 [16]. Иммунофенотип СК глиобластомы – CD133+/CD15+ [23; 25]; рака толстой кишки – CD133+/LR5+ [20; 29]; рака печени – CD24+/CD133+ [19]; рака легкого – CD133+/ALDH1+ [14; 18].

Антиген CD133 (PROM1) является промембран-1, который относится к молекулам адгезии [4]. Антиген CD133 – поверхностный гликопротеин, состоящий из пяти трансмембранных доменов.

Впервые он был идентифицирован как маркер гемопоэтической и нейронной СК. Антиген CD133 присутствует на нормальной СК и СКО многих солидных опухолей [14; 18–20; 22–25; 29]. Введение CD133<sup>+</sup> клеток медуллобластомы иммунодефицитным мышам приводило к развитию опухоли, экспрессирующей антиген CD133. EGF и VEGF стимулировали увеличение CD133<sup>+</sup>-клеток в культуре, а также усиливали экспрессию MMP. Это приводило к более быстрому росту клеток у безтиминовых мышей. Помимо MMP, на активность СКО влияет экспрессия молекул адгезии L-ICAM (CD171), которые определяют на CD133<sup>+</sup>-клетках. Подавление молекул адгезии приводит к апоптозу и ингибированию роста опухоли. Гипоксия увеличивала количество CD133<sup>+</sup>-клеток [17]. В CD133<sup>+</sup> опухолях гиперэкспрессирован Р-гикопротейн, продукт гена *MLU/MDR1*. Большинство авторов указывают на различное содержание CD133<sup>+</sup>-клеток в одной и той же опухоли.

Наиболее пригодными для характеристики и выделения клеток являются моноклональные антитела [1]. **Цель настоящей работы** – получение и характеристика МКА против антигена CD133.

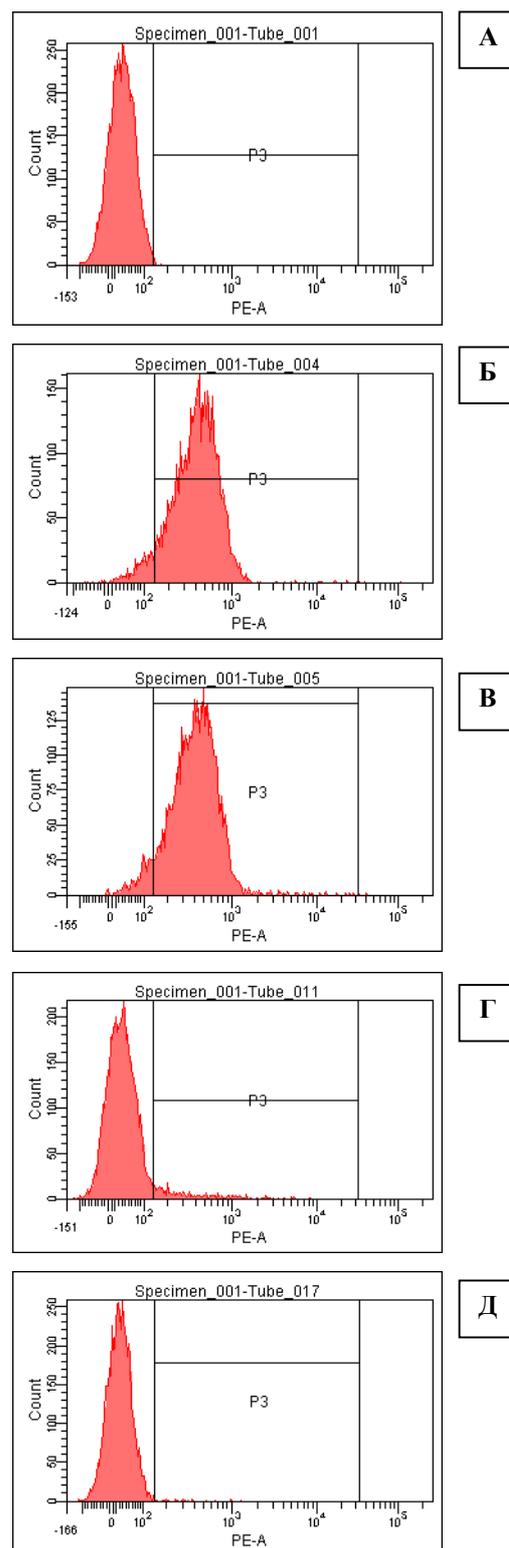
#### Материалы и методы

МКА против антигена CD133 ICO-401 получали путем слияния клеток мышинной миеломы NS-1 с клетками селезенки мышей линии BALB/C, предварительно трехкратно иммунизированных с интервалом в две недели клетками меланомы кожи человека линии mel IbrEE34RMCR [10]. Слияние проведено при помощи раствора ПЭГ ПЭГ/DMCO («Sigma»). Одну из гибридом, супернатант которой выявлял около 70–80 % АГ<sup>+</sup> клеток, дважды клонировали методом лимитирующих разведений. Очистку и метку антител проводили по методике, описанной Голубцовой Н.В. и др. [7].

Для скрининга полученных МКА ICO-401 в реакции иммунофлуоресценции использовались клеточные линии меланомы человека, различающиеся экспрессией антигена CD133, из коллекции ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» [9]. Эксперименты по изучению специфичности полученных антител повторяли не менее трех раз.

#### Результаты и обсуждение

Тестирование полученных МКА ICO-401 на клеточной линии mel IbrEE34RMCR выявило 80 % антиген-положительных клеток. В качестве положительного контроля для CD133 использовали МКА CD133/2 (293C3)-PE («MACS Miltenyi Biotec», Германия), которые также реагировали с 80 % клеток линии mel IbrEE34RMCR. Гистограммы распределения клеток, окрашенных МКА ICO-401-PE, и CD133/2 (293C3)-PE представлены на рис. 1. Сходство профилей флуоресценции МКА ICO-401-PE и CD133/2 (293C3)-PE позволило предположить, что эти антитела распознают один и тот же антиген (рис. 1, Б-В).



**Рис. 1.** Гистограммы распределения клеток mel IbrEE34RMCR:

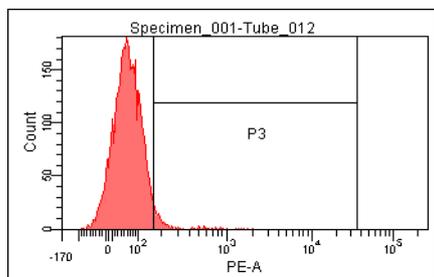
- А – контроль (неокрашенные клетки);
- Б – клетки, окрашенные МКА CD133/2 (293C3)-PE;
- В – клетки, окрашенные МКА ICO-401 PE;
- Г – клетки, инкубированные с насыщающей концентрацией МКА ICO-401 и проявленные МКА CD133/2 (293C3)-PE;
- Д – клетки, инкубированные с насыщающей концентрацией МКА ICO-401 и проявленные МКА ICO-401-PE.

Для изучения специфичности МКА ICO-401 использовали метод конкурентного ингибирования. Клетки линии mel IbrEE34RMCR первоначально инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с избытком немеченых МКА ICO-401, после чего инкубировали с МКА ICO-401-PE или CD133/2 (293C3)-PE. В результате инкубация клеток mel IbrEE34RMCR с насыщающей концентрацией МКА ICO-401 приводила к почти полной блокаде связывания с этими клетками CD133/2 (293C3)-PE (5 % клеток связывались с антителами) и ICO-401 PE (1,7 % клеток связывались с антителами; рис. 1, Г, Д).

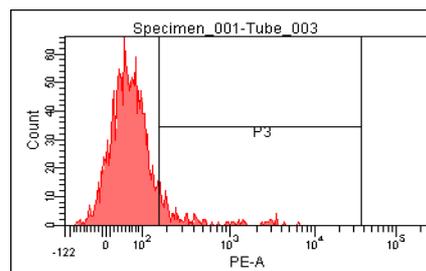
Для дальнейшей характеристики МКА ICO-401 был использован метод антигенной модуляции. Преинкубация клеток mel IbrEE34RMCR с МКА ICO-401 при температуре +37 °С приводила к снижению на клеточной поверхности антигена CD133, выявляемого МКА ICO-401-PE до 4,4 % после 3 ч инкубации и до 7,1 % после 20 ч. Тогда как при использовании МКА CD133/2 (293C3)-PE после 3 ч инкубации выявляли 80 % CD133, а после 20 ч инкубации – 21 % (рис. 2). Эти результаты свидетельствуют: МКА ICO-401 и МКА CD133/2PE реагируют с разными эпитопами молекулы CD133.

### Заключение

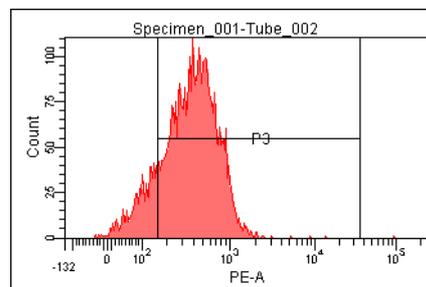
Получены и охарактеризованы антитела к CD133 ICO-401. Показано, что полученные антитела реагируют с антигеном CD133 так же, как и коммерческие антитела CD133/2 (293C3)-PE. Однако при использовании метода антигенной модуляции показано, что ICO-401-PE и CD133/2 (293C3)-PE распознают разные эпитопы молекулы CD133.



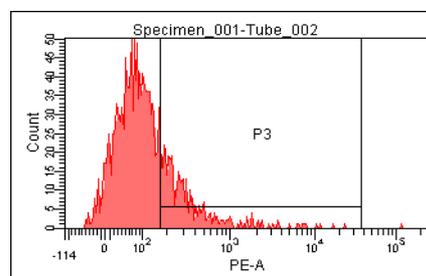
А



Б



В



Г

Рис. 2. Модуляция антигена CD133:

А – клетки, инкубированные с насыщающей концентрацией МКА ICO-401 в течение 3 ч при +37 °С и проявленные МКА ICO-401-PE;  
 Б – клетки, инкубированные с насыщающей концентрацией МКА ICO-401 в течение 20 ч при +37 °С и проявленные МКА ICO-401-PE;  
 Г – клетки, инкубированные с насыщающей концентрацией МКА ICO-401 в течение 3 ч при +37 °С и проявленные МКА CD133/2 (293C3)-PE;  
 Д – клетки, инкубированные с насыщающей концентрацией МКА ICO-401 в течение 20 часов при +37 °С и проявленные МКА CD133/2 (293C3)-PE (21%).

### Литература

1. Барышников А.Ю. Моноклональные антитела серии ИКО к дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека // Гематология и трансфузиология. – 1990. – №8. – С. 4.
2. Барышников А.Ю., Голубцова Н.В., Бузова О.С. и др. Экспрессия антигена CD44 у больных метастатической меланомой кожи // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – № 4. – С. 17–20.
3. Барышников К.А., Оборотова М.В., Барышников А.Ю. Экспрессия маркеров стволовой опухолевой клетки при злокачественных новообразованиях // Вестник «РОИЦ им. Н.Н. Блохина». – 2015. – Т.26 (дополн.). – С. 3–8.
4. Боценовский В.А., Барышников А.Ю. Молекулы клеточной адгезии // Успехи современной биологии. – 1994. – Т. 114, № 6. – С. 741.
5. Брюховецкий И.С., Брюховецкий А.С., Моценко П.В., Хотимченко Ю.С. Роль системных механизмов миграции и хоуминга стволовых клеток в развитии злокачественных опухолей центральной нервной системы и разработка новых методов противоопухолевой терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 3–12.
6. Вартанян А.А., Оборотова М.В. Основные детерминанты стволовой клетки меланомы // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 7–16.

7. Голубцова Н.В., Бурова О.С., Барышников К.А. и др. Моноклональные антитела ICO-401 против антигена CD133 // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 99–104.
8. Кадагидзе З.Г., Тупицын Н.Н., Заботина Т.Н. и др. Иммунофенотипические и функциональные особенности стволовых клеток лейкозов // Российский онкологический журнал. – 1996. – № 1. – С. 43–8.
9. Оборотова М.В., Бурова О.С., Барышникова М.А. и др. Экспрессия маркеров стволовых опухолевых клеток на клеточных линиях меланомы человека // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 1. – С. 7–11.
10. Сураева Н.М., Морозова Л.Ф., Самойлов А.В. и др. Изменение морфологических и иммунологических характеристик клеток меланомной линии (Mel Ibr) в результате воздействия куриного эмбрионального экстракта // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 159, № 4. – С. 521–4.
11. Туркина А.Г., Моисеенкова И.Н., Фролова Е.А. и др. «Примитивный» вариант бластного криза хронического миелолейкоза // Тер. архив. – 1995. – Т. 67, № 7. – С. 22–5.
12. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // Proc Natl Acad Sci USA. – 2003. – 100. – P. 3983–8.
13. Baryshnikov A.Y., Zabolina T.N., Sedyachina N.P. et al. Coexpression of antigens CD34 specific for early hematopoietic precursors and CD95 (Fas/APO-1) mediating apoptosis // Experimental oncology. – 1994. – 16. – P. 343.
14. Bertolini G., Roz L., Perego P. et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment // Proc Natl Acad Sci USA. – 2009. – 106. – P. 16281–6.
15. Bonnet D., Dick J.E. Human acute myeloid leukemia is a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell // Nat Med. – 1997. – 3. – P. 730–7.
16. Bruttel V.S., Wischhusen J. Cancer stem cell immunology: key to understanding tumorigenesis and tumor immune escape? // Front Immunol. – 2014. – 5. – P. 360.
17. Griguer C.E., Oliva C.R., Gobin E. et al. CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma // PLoS One. – 2008. – 3(11). – P. 3655–61.
18. Jiang F., Qiu Q., Khanna A. et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer // Mol Cancer Res. – 2009. – 7. – P. 330–8.
19. Lee T.K., Castilho A., Cheung V.C. et al. CD24(+) liver tumor-initiating cells drive self-renewal and tumor initiation through STAT3-mediated NANOG regulation // Cell Stem Cell. – 2011. – 9. – P. 50–63.
20. O'Brien C.A., Pollett A., Gallinger S., Dick J.E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice // Nature. – 2007. – 445. – P. 106–10.
21. Patrawala L., Calhoun T., Schneider-Broussard R. et al. Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells // Oncogene. – 2006. – 25. – P. 1696–708.
22. Prince M.E., Sivanandan R., Kaczorowski A. et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma // Proc Natl Acad Sci USA. – 2007. – 104. – P. 973–8.
23. Read T.A., Fogarty M.P., Markant S.L. et al. Identification of CD15 as a marker for tumor-propagating cells in a mouse model of medulloblastoma // Cancer Cell. – 2009. – 15. – P. 135–47.
24. Shmelkov S.V., Butler J.M., Hooper A.T. et al. CD133 expression is not restricted to stem cells/ and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumours // J Clin Invest. – 2008. – 118. – P. 2111–20.
25. Singh S.K., Clarke I.D., Terasaki M. et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors // Cancer Res. – 2003. – 63. – P. 5821–8.
26. Takaishi S., Okumura T., Tu S. et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44 // Stem Cells. – 2009. – 27. – P. 1006–20.
27. Turkina A.G., Baryshnikov A.Y., Sedyachina N.P. et al. Studies of P-glycoprotein in chronic myelogenous leukaemia patients: Expression, activity and correlations with CD34 antigen // British Journal of Haematology. – 1996. – 92. – P. 88–96.
28. Turkina A.G., Zabolina T.N., Kusnetsov S.V. et al. Studies of some mechanisms of drug resistance in chronic myeloid leukemia (CML) // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 1999. – 457. – P. 477–88.
29. Vermeulen L., Todaro M., de Sousa Mello F. et al. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multilineage differentiation capacity // Proc Natl Acad Sci USA. – 2008. – 105. – P. 13427–32.
30. Zhang S., Balch C., Chan M.W. et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors // Cancer Res. – 2008. – 68. – P. 4311–20.

УДК 616.24-006.25:615.277.3:615.011.5

М.П. Киселева<sup>1</sup>, З.С. Шпрах<sup>1</sup>, Л.М. Борисова<sup>1</sup>, И.Ю. Кубасова<sup>1</sup>, Л.Г. Деженкова<sup>2</sup>, Д.Н. Калужный<sup>3</sup>,  
А.В. Ланцова<sup>1</sup>, Е.В. Санарова<sup>1</sup>, А.А. Штиль<sup>1</sup>, Н.А. Оборотова<sup>1</sup>, З.С. Смирнова<sup>1</sup>, А.Ю. Барышников<sup>1</sup>

## ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНОГО N-ГЛИКОЗИДА ИНДОЛКАРБАЗОЛА ЛХС-1208. СООБЩЕНИЕ II

<sup>1</sup>ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

<sup>2</sup>ФГБНУ Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе, Москва

<sup>3</sup>Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва

### Контактная информация

Киселева Марина Петровна, научный сотрудник лаборатории экспериментальной химиотерапии НИИ ЭДuТО

адрес: 115478 Москва, Каширское шоссе, 24; тел: +7(499)612-87-86

e-mail: [marina-kiselyova@mail.ru](mailto:marina-kiselyova@mail.ru)

Статья поступила 08.05.2015, принята к печати 10.06.2015/

### Резюме

Представлены результаты доклинического изучения противоопухолевой активности производного N-гликозида индокарбазола ЛХС-1208 на эпидермоидной LLC и исследованы механизмы противоопухолевого действия. При изучении избирательности противоопухолевого действия ЛХС-1208 на LLC рассчитан терапевтический индекс  $TI_{50}$ , равный 2,8. Оценка действия на метастазирование LLC в легкие мышей ЛХС-1208 в дозах 125 мг/кг и 150 мг/кг показывает, что применение соединения в качестве адъювантной химиотерапии (ТРМ=45 % и 44 % соответственно) более эффективно, чем при неадъювантной химиотерапии (ТРМ=33 % и 31% соответственно). Установлено преимущество ЛХС-1208 по длительности противоопухолевого действия в сравнении с иринотеканом: в течение 20 дней после окончания лечения ТРО составляет 95 % – 52 % и 94 % – 27% соответственно. Комбинация ЛХС-1208 с иринотеканом в дозах, составляющих половину от терапевтической дозы комбинантов (75 мг/кг и 33 мг/кг соответственно) вызывает синергический противоопухолевый эффект. Механизм противоопухолевого действия обусловлен интеркаляцией ЛХС-1208 в двухцепочечную ДНК и ингибированием активности топоизомеразы I.

**Ключевые слова:** производное индокарбазола, ЛХС-1208, противоопухолевая активность, эпидермоидная карцинома легкого, интеркаляция, ДНК, топоизомераза I.

M.P. Kiseleva<sup>1</sup>, Z.S. Shprakh<sup>1</sup>, L.M. Borisova<sup>1</sup>, I.Yu. Kubasova<sup>1</sup>, L.G. Dezhenkova, D.N. Kaluzhny<sup>3</sup>,  
A.V. Lantsova<sup>1</sup>, E.V. Sanarova<sup>1</sup>, A.A. Shtil<sup>1</sup>, N.A. Oborotova<sup>1</sup>, Z.S. Smirnova<sup>1</sup>, A.Yu. Baryshnikov<sup>1</sup>

## PRECLINICAL STUDY OF ANTITUMOR ACTIVITY OF INDOLOCARBAZOLES N-GLYCOSIDES DERIVATIVE LCS-1208. REPORT II

<sup>1</sup>FSBI «N.N. Blokhin RCRC», Moscow

<sup>2</sup>FSBSI G.F. Gause Institute of New Antibiotic, Moscow

<sup>3</sup>V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology of RAS, Moscow

### Abstract

The report presents the results of preclinical study of N-glycoside indolocarbazole derivative LCS-1208 antitumor activity in epidermoid LLC; mechanisms of antitumor action were studied as well. Therapeutic index  $TI_{50}$  equal to 2.8 was calculated during evaluation of LCS-1208 antitumor selective action on LLC. The assessment of LCS-1208 effect on metastasis in lungs in doses 125 mg/kg and 150 mg/kg shows that the agent is more effective as adjuvant chemotherapy (MGI=45% and 44%, respectively) than neoadjuvant chemotherapy (MGI=33% and 31%, respectively). LCS-1208 had the proved advantage of antitumor effect duration compared to irinotecan: TGI was 95% – 52% and 94% – 27%, respectively, for 20 days after completed therapy. Combination of LCS-1208 with irinotecan in half doses of those combined agents (75 mg/kg and 33 mg/kg, respectively) resulted in synergic antitumor effect. Mechanism of antitumor action is determined by LCS-1208 intercalation in the two-stranded DNA and inhibition of topoisomerase I function.

**Key words:** indolocarbazole derivative, LCS-1208, antitumor activity, epidermoid Lewis lung carcinoma (LLC), intercalation, DNA, topoisomerase I.

### Введение

В сообщении I [8] представлены результаты доклинического изучения противоопухолевого дей-

ствия производного N-гликозида индокарбазола ЛХС-1208. Установлена зависимость противоопухолевой активности препарата от дозы и режима применения на моделях опухолей разного гистогенеза. Так, на лимфобластозах (лейкоз Р-388 и лим-

фаденоз Фишера L5178Y) показана высокая эффективность ЛХС-1208 (25 мг/кг) при ежедневном внутривенном введении в течение 5 дней (УПЖ=76 % и 83 % соответственно). На модели лимфаденоза Фишера в 33 % случаев наблюдается полное излечение животных, проживших 90 дней без признаков опухолевого процесса. На моделях солидных опухолей – LLC и рака шейки матки РШМ-5 – ЛХС-1208 эффективен при однократном внутривенном введении в дозе 150 мг/кг (ТРО=95 % – 81 % и ТРО=74 % – 56 % в течение 9 дней соответственно). При исследовании противоопухолевого действия ЛХС-1208 на развившуюся опухоль LLC показано статистически значимое торможение роста опухоли: 51 % и 47 % на 3 и 7 дни соответственно, после однократного внутривенного введения в дозе 150 мг/кг.

Сравнительное изучение эффективности лекарственной формы ЛХС-1208 и субстанции на модели LLC при внутрибрюшинном введении показало преимущество лекарственной формы препарата в дозе 110 мг/кг. Лекарственная форма вызвала торможение роста опухоли на 74 % – 75 % в течение 8 дней после окончания лечения, а субстанция на 39 % – 8 %.

Изучение механизма противоопухолевого действия и выявление клеточных мишеней, наряду с основными критериями оценки противоопухолевой активности, – обязательное требование к доклиническому исследованию новых препаратов [1–3; 10]. Известно, что соединения класса N-гликозидов индолокарбазолов взаимодействуют с различными внутриклеточными мишенями: интеркалируют в ДНК, что приводит к изменению конформации и повреждению двойной спирали [17; 25–27; 29; 33]; снижают активность протеинкиназ: циклинзависимой киназы CDK-1, протеинкиназы C, топоизомераз. Эти мишени важны для индукции гибели клеток [9; 12; 15; 16; 20–22; 28; 30–32]. Кроме того, под действием производных индолокарбазола отмечена вакуолизация цитоплазмы, связанная с активацией вакуолярной АТФазы [14].

Цель настоящего исследования – продолжение доклинического изучения противоопухолевой активности производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208 на эпидермоидной карциноме легкого Lewis и изучение механизма его противоопухолевого действия.

### Материалы и методы

Исследования *in vivo* проведены на модели эпидермоидной карциномы легкого мышей Lewis, полученной из Банка опухолевых штаммов ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина». В опытах использованы иммунокомпетентные мыши-самцы линии C57Bl/6j (доноры опухолевого материала) и гибриды первого поколения BDF<sub>1</sub> (C<sub>57</sub>Bl/6j x DBA/2) массой 20 – 22 г. Мышей получали из питомника лабораторных животных «Столбовая» и содержали в конвенциональных условиях на брикетированном рационе кормления [4].

LLC перевивали животным по стандартной методике. При перевивке опухолевую ткань измельчали ножницами до гомогенной консистенции, добавляли среду 199 до соотношения 1:10 и 0,5 мл полученной суспензии (около 50 мг опухолевых клеток) вводили подкожно в область правой подмышечной впадины. Лечение начинали через 48 ч после перевивки [13].

Лекарственная форма ЛХС-1208 – лиофилизат для приготовления раствора для инъекций следующего состава: субстанция 9,2 мг; ДМСО 165 мг; Kollidon 17PF 600 мг.

Перед введением животным лиофилизат регидратировали в 2,8 мл воды для инъекций и вводили внутривенно однократно в дозах 125 мг/кг и 150 мг/кг.

Для оценки избирательности противоопухолевого действия ЛХС-1208 рассчитывали терапевтический индекс ТИ<sub>50</sub>, как соотношение дозы, вызывающей гибель 50 % мышей, к эффективной дозе, вызывающей ТРО мышей также на 50 %. ЛХС-1208 вводили в диапазоне доз от 50 мг/кг до 170 мг/кг. Значение ТИ<sub>50</sub> для эффективных препаратов должно быть  $\geq 2$  [10].

В качестве препарата сравнения использовали ингибитор топоизомеразы I – коммерческий препарат иринотекан (Кампто, производитель: Пфайзер (Перт) Пти Лтд., Австралия) [5; 19; 23; 24].

Препарат вводили внутривенно трехкратно в дозе 40 мг/кг с интервалом 72 ч и однократно в дозе 66 мг/кг, то есть в эквивалентных дозах и режимах введения, которые применяются в клинике при монотерапии немелкоклеточного рака легкого [6; 11; 18].

Изучение эффективности ЛХС-1208 проводили также в комбинации с иринотеканом. Комбинанты вводили в дозах, составляющих 1/2 от терапевтической дозы препаратов. В качестве положительного контроля вводили ЛХС-1208 и иринотекан в терапевтических дозах, что позволяло при равном противоопухолевом эффекте в сравниваемых группах оценить терапевтический эффект комбинации (ЭК) [10]. Дозы и режимы введения указаны в табл. 2 и 4.

Опухоли измеряли каждые 3 – 4 дня в зависимости от скорости роста опухоли. Объем опухоли (V) вычисляли перемножением трех максимальных взаимно перпендикулярных размеров (длина *l*, ширина *b*, высота *h*) у каждого животного.

Критериями оценки противоопухолевой активности служили: ТРО, % и УПЖ, % опытных животных по сравнению с контрольными [10].

Торможение роста опухоли вычисляли по формуле:

$$TPO(\%) = \frac{(V_k - V_o)}{V_k} \times 100, \text{ где}$$

V<sub>k</sub> – средний объем опухолей в контрольной группе (мм<sup>3</sup>),

V<sub>o</sub> – средний объем опухолей в опытной группе (мм<sup>3</sup>).

Увеличение продолжительности жизни вычисляли по формуле:

$$УПЖ(\%) = \frac{(СПЖ_0 - СПЖ_к)}{СПЖ_к} \times 100, \text{ где}$$

СПЖ<sub>к</sub> – средняя продолжительность жизни животных в контрольной группе (дни);

СПЖ<sub>0</sub> – средняя продолжительность жизни животных в опытной группе (дни).

Для изучения влияния ЛХС-1208 на метастазирование LLC в легкие, мышцей подвергали эктаназии на 30-й день после гибели 1-й мыши в контрольной группе и оценивали торможение роста метастазов по средней массе легких в опытных группах и контроле. Опухолевый узел удаляли на 9 день после перевивки LLC, препарат вводили на 10 день.

Критерием оценки способности ингибировать метастазирование в легкие служило торможение роста спонтанных метастазов (ТРМ, %) при подкожной перевивке LLC в присутствии первичного опухолевого узла и на фоне удаленной опухоли [7].

Торможение роста метастазов вычисляли по формуле:

$$ТРМ(\%) = \frac{(МЛ_к - МЛ_0)}{МЛ_к} \times 100, \text{ где}$$

МЛ<sub>к</sub> – средняя масса легких животных в контрольной группе (мг);

МЛ<sub>0</sub> – средняя масса легких животных в опытной группе (мг).

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

Для изучения влияния ЛХС-1208 на каталитическую активность топоизомеразы I реакционную смесь, содержащую суперскрученную ДНК плазмиды pBR322 (ДНКсс; «Ферментас», Литва) инкубировали с 1 ЕД топоизомеразы I в отсутствие (контроль) и присутствии ЛХС-1208 (0,5-20 мкМ) при 37 °С в течение 30 мин. в буфере, содержащем 35 мМ Трис-НСI (рН 8,0), 72 мМ КСI, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ дитиотрейтола, 2 мМ спермидина, 0,1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. Реакцию останавливали внесением додецилсульфата натрия (до 1%). Добавляли протеиназу К и инкубировали смесь 30 мин при 37 °С. Электрофорез ДНК проводили в 1% агарозном геле (состав буфера: 40 мМ Трис-основания, 1 мМ ЭДТА, 30 мМ ледяной уксусной кислоты); гели окрашивали раствором бромистого этидия и визуализировали в УФ-свете.

Взаимодействие ЛХС-1208 с ДНК изучали в присутствии 13,7 мкМ пар оснований ДНК тимуса телят (Sigma-Aldrich, США). Измерения проводили в растворе, содержащем 10 мМ фосфатного

буфера (рН 7,8) и 100 мМ NaCl, применяя метод спектрального анализа. Реагенты приобретали в компании Хеликон (Москва). По изменению спектров поглощения определяли взаимодействие исследуемого соединения с ДНК. Кроме того, исследовали концентрацию связанного и концентрацию не связавшегося (свободного) соединения. На основании этих данных строили изотерму связывания в координатах Скэтчарда. По полученным показателям судили о параметрах связывания молекул ЛХС-1208 с дуплексной ДНК.

### Результаты и обсуждение

Изучение избирательности противоопухолевого действия ЛХС-1208 на LLC показало, что доза, вызывающая гибель 50 % мышей, составляла 170 мг/кг; доза, вызывающая ТРО ~50 %, составила 60 мг/кг (табл. 1). Терапевтический индекс  $TI_{50} = 2,8$ .

Данные, представленные в табл. 2, показывают, что ЛХС-1208 в дозе 150 мг/кг обладал более высоким противоопухолевым действием по сравнению с иринотеканом в дозе 66 мг/кг по длительности торможения роста LLC (ТРО=95 % – 52 % и ТРО=94 % – 27 % в течение 20 дней после окончания лечения соответственно). Иринотекан при трехкратном введении в дозе 40 мг/кг проявлял кратковременный и слабый противоопухолевый эффект (ТРО=61%).

Как видно из табл. 3, при сохраненном опухолевом узле ЛХС-1208 вызывал статистически значимое торможение роста метастазов LLC как в дозе 125 мг/кг, так и в терапевтической дозе 150 мг/кг: ТРМ 33% и 31 % соответственно. При введении ЛХС-1208 в тех же дозах после удаления первичного опухолевого узла препарат оказывал более высокий эффект по ТРМ: 45 % и 44 % соответственно. В то же время ТРМ, равное 30 % в группе с хирургическим удалением первичного опухолевого узла, оказалось статистически недостоверным по отношению к контролю.

Из данных табл. 4 следует, что комбинация ЛХС-1208 с иринотеканом на модели LLC проявляла длительную противоопухолевую активность в течение 20 дней после окончания лечения: ТРО=94 % – 51 %. В то же время ЛХС-1208 в дозе 75 мг/кг вызывал противоопухолевый эффект только в течение 9 дней (ТРО=82 % – 48 %), равный действию иринотекана в дозе 33 мг/кг в те же сроки наблюдения (ТРО=86 % – 52 %). Следовательно, комбинация ЛХС-1208 с иринотеканом в дозах, составляющих половину от терапевтической дозы комбинантов (75 мг/кг и 33 мг/кг), проявила синергический противоопухолевый эффект на LLC, то есть терапевтический эффект комбинации оказался меньше суммарного эффекта, но больше, чем при введении равных по эффекту комбинантов.

На рис. 1 приведена электрофореграмма продуктов релаксации ДНКсс под действием топоизомеразы I. В отсутствие ЛХС-1208 плазмиды pBR322 мигрирует в геле относительно быстро (трек ДНКсс).

Таблица 1

Избирательность противоопухолевого действия ЛХС-1208 на LLC при однократном внутривенном введении

№№ групп	Доза (мг/кг)	ТРО, %					Гибель от токсичности, %
		Дни после окончания лечения					
		5	8	12	15	19	
1	50	37	14	15	16	12	0
2	60	54	36	30	23	14	0
3	75	76	58	37	22	15	0
4	100	96*	68*	50*	38	21	0
5	150	99*	96*	64*	57*	50*	0
6	170	93*	91*	63*	57*	49*	50

\*p&lt;0,05 по отношению к контролю

Таблица 2

Сравнительное изучение противоопухолевой активности ЛХС-1208 и терапевтического действия иринотекана при в/в введении на LLC

Препарат	№№ групп	Доза(мг/кг)/интервал (час) × число введений	ТРО, %						УПЖ, %
			Дни после окончания лечения						
			5	8	12	15	20	25	
ЛХС-1208	1	150×1	95**	74	64*	50*	52*	43	20
	2	155×1	97	91	74	59	40	41	15
Ирино-текан	3	40/72×3	61**	30	9	2	8	6	14
	4	66×1	94	73	44*	31*	27*	28	15

\*p&lt;0,05 между группами 1 и 4;

\*\*p&lt;0,05 между группами 1 и 3.

Таблица 3

Изучение влияния ЛХС-1208 на метастазирование LLC в легкие при однократном в/в введении

Группа	Доза, мг/кг	Масса тела, г		Масса легких, мг	ТРМ, %
		Исходная	После эвтаназии		
Контроль	–	24,6±2,1	29,3±2,4	447,9±148,9	–
Хирургическое удаление опухоли	–	25,5±1,8	23,9±2,3	314,1±102,7	30
ЛХС-1208	125	24,1±2,5	26,1±6,3	298,3±66,8	33*
	150	25,3±2,4	26,2±5,0	310,4±88,5	31*
Удаление опухоли + ЛХС-1208	125	24,0±1,4	24,1±4,0	247,5±39,8	45*
	150	25,2±1,9	23,8±2,5	252,6±49,8	44*

\*p&lt;0,05 по отношению к контролю

Таблица 4

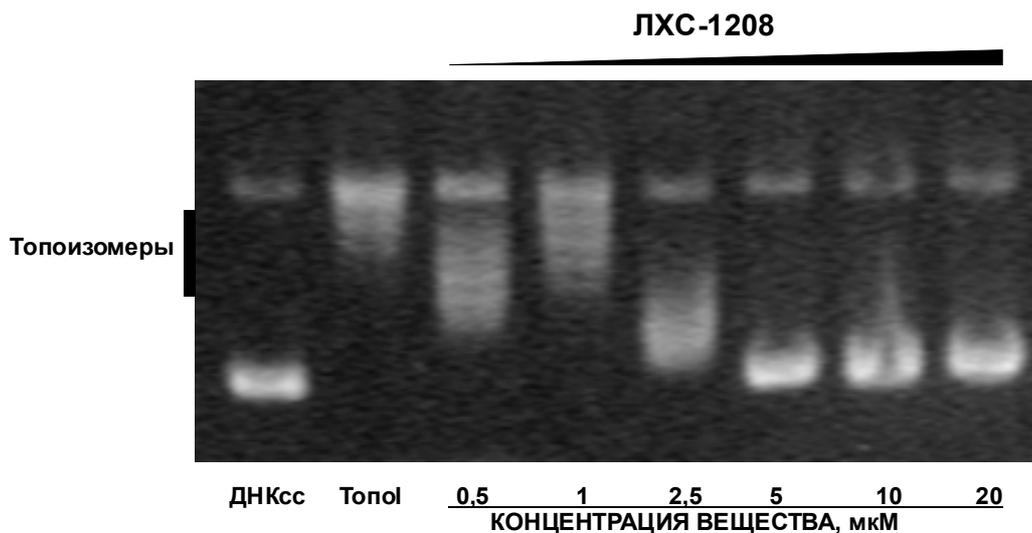
Изучение эффективности ЛХС-1208 в комбинации с иринотеканом на LLC при однократном внутривенном введении

Группа	№№ групп	Доза, мг/кг	ТРО, %						УПЖ, %
			Дни после окончания лечения						
			5	9	13	16	20	23	
ЛХС-1208	1	75	82*	48*	35*	27*	36*	17	17
	2	150	92	66	56	57	50	36	13
Иринотекан	3	33	86*	52*	33*	27*	28*	21	14
	4	66	93	80	53	48	43	28	14
ЛХС-1208 + иринотекан	5	75 + 33	94*	85*	59*	54*	51*	35	17

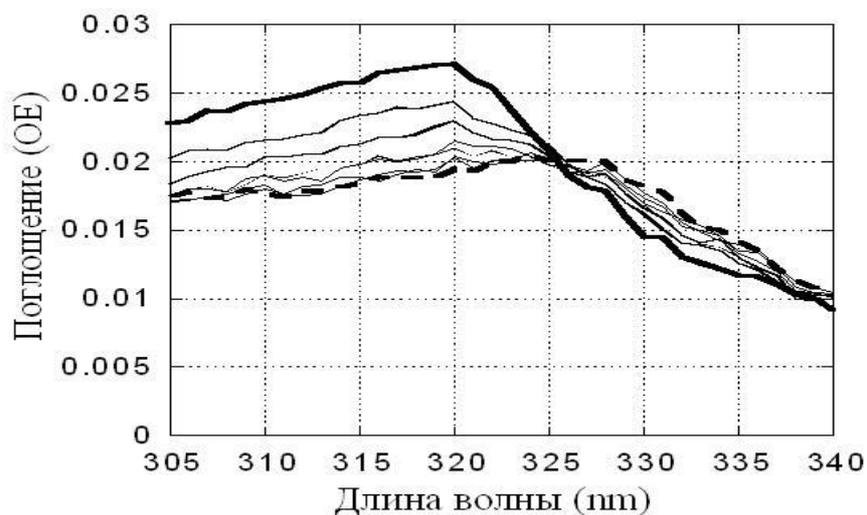
\*p&lt;0,05 – различия достоверны между группами 5 и 1; 5 и 3

В присутствии ЛХС-1208 плазмидная ДНК изменяет конформацию: релаксирует с образованием набора топоизомеров, мигрирующих в геле медленнее ДНКсс (трек Топо I). С увеличением концентрации ЛХС-1208 количество медленно мигрирующих (релаксированных) молекул ДНК уменьшается, что свидетельствует о частичном торможении релаксации ДНК. При концентрациях ЛХС-1208 >5 мкМ актив-

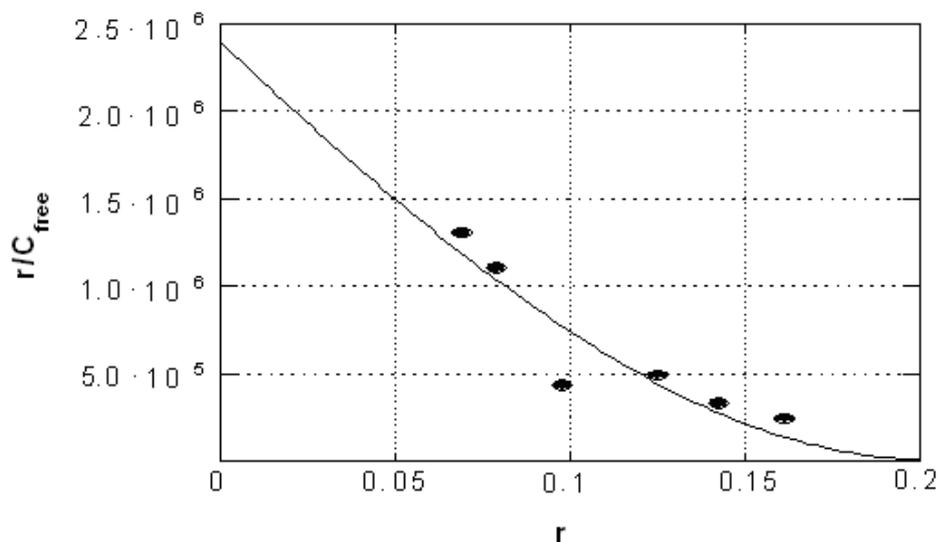
ность топоизомеразы I ингибирована: присутствует только конформация ДНКсс. Как видно из рис. 2, при взаимодействии с двухцепочечной ДНК изменяются спектры поглощения ЛХС-1208 (сплошная линия – 1 мкМ свободного ЛХС-1208, пунктирная – в присутствии 13,7 мкМ пар оснований ДНК). Такой характер спектров характерен для интеркаляционного типа комплексов низкомолекулярных соединений с ДНК.



**Рис. 1.** Влияние ЛХС-1208 на релаксацию плазмидной ДНК, опосредованную топоизомеразой I. Сокращения и пояснения – в тексте.



**Рис. 2.** Взаимодействие ЛХС-1208 с дуплексной ДНК.



**Рис. 3.** Изотерма связывания ЛХС-1208 с дуплексной ДНК:

По оси абсцисс – среднее количество молекул ЛХС-1208 ( $r$ ) на один нуклеотид; по оси ординат – соотношение среднего количества молекул ЛХС-1208 к концентрации несвязанного ЛХС-1208 ( $r/C_{\text{free}}$ ).

По концентрациям связанного и свободного ЛХС-1208 построена изотерма связывания ЛХС-1208 с ДНК в координатах Скэтчарда (рис. 3), аппроксимированная уравнением МакГи-фон Хиппеля. Установлены параметры связывания:  $K=(2,4\pm 0,5)\times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ,  $n=4,5\pm 0,5$ . Последний показатель означает, что одна молекула ЛХС-1208 занимает участок в дуплексе ДНК, соответствующий 4–5 нуклеотидным остаткам.

### Заключение

В результате исследований противоопухолевого эффекта производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208 в широком диапазоне доз от 50 мг/кг до 170 мг/кг на модели LLC показана избирательность противоопухолевого действия: терапевтический индекс  $TI_{50} = 2,8$ .

При сравнительном изучении противоопухолевого эффекта ЛХС-1208 и иринотекана при однократном внутривенном введении в терапевтических дозах 150 мг/кг и 66 мг/кг соответственно, установлено, что ЛХС-1208 достоверно превосходит действие иринотекана по длительности торможения роста LLC: ТРО=95 % – 52 % и ТРО=94 % – 27 % в течение 20 дней после окончания лечения соответственно.

При оценке действия на метастазирование LLC в легкие мышей установлено, что ЛХС-1208 (125 мг/кг и 150 мг/кг, однократное внутривенное введение) при сохраненном опухолевом узле вызы-

вает статистически значимое ТРМ, равное 33 % и 31 % соответственно, и, следовательно, перспективен для неoadьювантной химиотерапии. При введении ЛХС-1208 в тех же дозах после удаления опухолевого узла ТРМ составляет 45 % и 44 % соответственно. Возможно, применение ЛХС-1208 для адьювантной химиотерапии окажется более эффективным.

Комбинация ЛХС-1208 с иринотеканом в дозах, составляющих половину от терапевтической дозы комбинантов (75 мг/кг и 33 мг/кг соответственно), проявляет синергический противоопухолевый эффект на модели LLC: результат применения комбинации меньше суммарного эффекта, но больше, чем при введении равных по эффекту комбинантов. Можно предположить, что введение ЛХС-1208 с иринотеканом в меньших, чем при монотерапии, дозах не приведет к суммации побочных эффектов.

Соединение ЛХС-1208 интеркалирует в двухцепочечную ДНК с образованием высокоаффинных комплексов. Одна молекула ЛХС-1208 занимает участок, соответствующий 4–5 нуклеотидным остаткам. Вызываемые комплексобразованием нарушения конформации двойной спирали нарушают матричные синтезы. Действительно, ЛХС-1208 в микромолярных концентрациях ингибирует топоизомеразу I. Таким образом, установлены мишени и молекулярные механизмы, обуславливающие противоопухолевую эффективность производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208.

### Литература

1. Барышникова М.А., Барышников А.Ю. Иммунолипосомы и мишени их действия // Российский химический журнал. Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева. – 2012. – Т. LVI, № 3–4. – С. 60–7.
2. Блохин Д.Ю., Чмутин Е.Ф., Иванов П.К. Молекулярные мишени для противоопухолевой терапии: факторы роста, ангиогенеза, апоптоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 25–30.
3. Блохин Д.Ю., Чмутин Е.Ф., Иванов П.К. Молекулярные мишени для противоопухолевой терапии: пути передачи сигнала и эпигенетические модуляторы // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 81–8.
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. – С. 1–53.
5. Борисов К.Е. Место ингибиторов топоизомеразы I в лечении мелкоклеточного рака легкого (обзор) // Онкология. Журнал имени П.А. Герцена. – 2014. – № 3. – С. 88–96.
6. Гарин А.М., Базин И.С. Кампто (иринотекан) препарат с широким спектром противоопухолевого действия // Фарматека. – 2002. – Т. 63, №12. – С. 9.
7. Зуева Е.П., Козлов А.М., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по доклиническому изучению средств, обладающих способностью ингибировать процесс метастазирования и повышать эффективность цитостатической терапии злокачественных опухолей. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ под общей ред. член-корр. РАМН проф. Р.У. Хабриева. – 2 изд., переработанное и доп.- М.: ОАО изд. «Медицина», 2005. – С. 674–82.
8. Киселева М.П., Шпрах З.С., Борисова Л.М. и др. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208. Сообщение I // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 71–7.
9. Киселева М.П., Шпрах З.С., Деженкова Л.Г. и др. Действие производного индолокарбазолов ЛХС-1208 на топоизомеразу I // Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с меж-

- дународным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» Москва, 31 марта – 1 апреля 2015 г. Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 1. – С. 89.
10. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 640–54.
  11. *Переводчикова Н.И., Горбунова В.А.* (ред.) Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. М.: Практическая медицина, 2015. – 686 с.
  12. *Смирнова З.С., Борисова Л.М., Киселева М.П. и др.* Поиск ингибиторов топоизомераз I и /или II среди N- гликозидов производных индоло [2,3-а] карбазолов для лечения злокачественных опухолей // «Результаты фундаментальных и прикладных исследований для создания новых лекарственных средств». Материалы симпозиума. Москва, 9 – 11 июня 2008 г. - М.: Фирма «Слово», 2008. – С. 191–2.
  13. *Софьина З.П., Сыркин А.Б. (СССР), Голдин А., Кляйн А. (США)* (ред.). Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. – М.: Медицина, 1980. – С. 71–112.
  14. *Татарский В.В.* Механизмы гибели опухолевых клеток при действии новых углеводных производных индолокарбазолов. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – М., 2010. – 108 с.
  15. CHAMPOUX J.J. *DNA TOPOISOMERASES: STRUCTURE, FUNCTION, AND MECHANISM* // ANNU. REV. BIOCHEM. – 2001. – 70. – P. 369–413.
  16. *Chillemi G., Fioranil P., Benedetti P. et al.* Protein concerted motions in the DNA-human topoisomerase I complex // Nucleic Acids Res. – 2003. – 31. – P. 1525–35.
  17. *Denny W.A.* Emerging DNA topoisomerase inhibitors as anticancer drugs // Expert Opin. Emerg. Drugs. – 2004. – 9. – P. 105–33.
  18. *Fukuoka M., Negoro S., Masuda N. et al.* Final results of phase III study of irinotecan (CPT-11) plus cisplatin versus vindesine plus cisplatin versus CPT-11 alone in advanced non-small cell lung cancer. Program and abstracts of the 25th Congress of the European Society for Medical Oncology; October 13-17, 2000; Hamburg, Germany. Abstract 485.
  19. *Garcia-Carbonero R., Supko J.G.* Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins // Clinical Cancer Research. – 2002. – 8. – P. 641–61.
  20. *Gupta M., Fujimori A., Pommier Y.* Eukaryotic DNA topoisomerases I // Biochem. Biophys. Acta. – 1995. – 1262. – P. 1–14.
  21. *Kaufmann S.* DNA topoisomerases in chemotherapy // Cancer Cells. – 1991. – 3. – P. 24–7.
  22. *Liu L.F.* DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs // Ann. Rev. Biochem. – 1989. – 58. – P. 351–75.
  23. *Mathijssen R.H.J., Loos W.J., Verweij J. et al.* Pharmacology of topoisomerase I inhibitors Irinotecan (CPT-11) and topotecan // Current Cancer Drug Targets – 2002. – 2. – P. 103–23.
  24. *Meng L.-H., Liao Z.-Y., Pommier Y.* Non-camptothecin DNA topoisomerase I inhibitors in cancer therapy // Current Topics in Medicinal Chem. – 2003. – 3(3). – P. 305–20.
  25. *Pabo C.O., Sauer R.T.* Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition // Annu. Rev. Biochem. – 1992. – 61. – P. 1053–95.
  26. *Perini R., Caserta M., Di Mauro E.* DNA tridimensional context affects the reactivity of eukaryotic DNA topoisomerase I // J. Mol. Biol. – 1993. – 231. – P. 634–45.
  27. *Pommier Y., Pourquier P., Fan Y. et al.* Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme // Biochem. Biophys. Acta – 1998. – 1400. – P. 83–106.
  28. STEWART L., IRETON G.C., CHAMPOUX J.J. *THE DOMAIN ORGANIZATION OF HUMAN TOPOISOMERASE I* // J. BIOL. CHEM. – 1996. – 271. – P. 7602–8.
  29. *Streltsov S.A., Grokhovskii S.L., Kudelina I.A. et al.* The behavior of the DNA topoisomerase I Inhibitor in aqueous solution // J. Biomol. Struct. Dyn. – 2001. – 18(6). – P. 913–4.
  30. WANG J.C. *CELLULAR ROLES OF DNA TOPOISOMERASES: A MOLECULAR PERSPECTIVE* // NATURE. – 2002. – 3. – P. 430–40.
  31. *Wong R.S.* Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment // J. Exp Clin Cancer Res. – 2011. – 26. – P. 30–87.
  32. *Yamashita Y., Fujii N., Murakata C. et al.* Induction of mammalian DNA topoisomerase I mediated DNA cleavage by antitumor indolocarbazole derivatives // Biochemistry. – 1992. – 31. – P. 12069–75.
  33. *Zimmer C., Wahnert U.* Nonintercalating DNA-binding ligands: specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological investigations of the genetic material // Prog. Biophys. Mol. Biol. – 1986. – 47. – P. 31–112.

Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты»

*Т.Н. Богатыренко<sup>1</sup>, З.В. Куроптева<sup>2</sup>, Л.Н. Байдер<sup>2</sup>, Т.Е. Сашенкова<sup>1</sup>, Д.В. Мищенко<sup>1</sup>, Н.П. Коновалова<sup>2</sup>*

### **ЭКЗО- И ЭНДОГЕННЫЕ ИСТОЧНИКИ NO ПРИ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ЦИТОСТАТИКОВ**

<sup>1</sup>ИПХФРАН, Черноголовка

<sup>2</sup>ИБХФ РАН, Москва

**Актуальность.** Парадоксальная дихотомия воздействия NO – в зависимости от его концентрации в организме приводящая либо к терапевтическому эффекту, либо к канцерогенезу была положена в основу настоящей работы.

**Задача исследования.** Изучить влияние экзогенных (нитрат натрия в разных концентрациях – 40 мг/кг, 30 мг/кг, 15 мг/кг) и эндогенных (аскорбиновая кислота – 15 мг/кг) источников NO в зависимости от их концентрации в организме на химиотерапевтическое действие цитостатиков: цисплатина (сPt) циклофосфана (ЦФ).

**Материалы и методы** представлены в статье [Т.Н.Богатыренко и др. Вопросы онкологии, 2013, 1, с94-99].

**Результаты.** Было показано, что добавление через 4 часа аскорбиновой кислоты (АК) к лечению сPt и ЦФ увеличивает СПЖ (среднюю продолжительность жизни) на 20–30 % по сравнению с монотерапией цитостатиками. Композиции NaNO<sub>3</sub> с цитостатиками увеличивают СПЖ на 26 %, 38 %, 4 % в зависимости от концентрации вводимого NaNO<sub>3</sub>. Добавление к этим композициям АК изменяло СПЖ от увеличения на 16 % до ингибирования на 40 %.

**Выводы.** Изменение количества экзогенно вводимого NaNO<sub>3</sub>, являющегося донором NO, в сочетании с эндогенным NO, индуцированным в организме АК, коррелирует с изменением активности исследуемых цитостатиков.

*А.А. Борунова, Г.З. Чкадуа, Т.Н. Заботина, О.В. Короткова, Д.В. Табаков, И.Н. Михайлова, З.Г. Кадагидзе*

### **Т ЛИМФОЦИТЫ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ ПРИ ВАКЦИНОТЕРАПИИ**

*ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва*

**Целью** данной работы было выявить значение количественного нарушения Т лимфоцитов (CD3+CD19-CD16-) у онкологических больных до вакцинотерапии.

**Материалы и методы.** Был изучен иммунофенотип лимфоцитов периферической крови 30 больных диссеминированной меланомой кожи без клинических признаков заболевания (после хирургического удаления опухоли) до начала вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками и 20 здоровых доноров. Иммунофенотип лимфоцитов оценивали методом многоцветной проточной цитометрии.

**Результаты.** По данным иммунологического исследования больные были разделены на группы: две равные (по 14 пациентов) – с нормальным количеством Т-лимфоцитов 67,6%±6,1% и со сниженным – 46,6%±6,9%, и только у двух больных количество Т клеток до начала терапии было выше показателей нормы (84,8% и 81,9%). Интересным оказалось то, что на фоне проводимой терапии у всех больных с исходно низким количеством Т-клеток отмечалось прогрессирование основного заболевания. А в группе с нормальным содержанием Т-лимфоцитов только 9 пациентов на фоне вакцинотерапии оставались в ремиссии. При этом у 5 больных, несмотря на исходно нормально количество этих клеток, на фоне терапии отмечалось прогрессирование. Из двух больных с высоким количеством Т-лимфоцитов до начала лечения у одного выявлено прогрессирование заболевания, а другой оставался в ремиссии. Следует отметить, что в группе больных с низким содержанием Т-клеток отмечается еще одно нарушение, снижение иммунорегуляторного индекса – ИРИ (0,9±0,3). В группе больных с нормальным содержанием Т-клеток и безрецидивным течением заболевания, соотношение субпопуляций CD4+ и CD8+ лимфоцитов (ИРИ) также оставалось в пределах нормы (1,3±0,3), а у больных с прогрессированием показатель CD4+/CD8+ был снижен (0,9±0,3).

**Выводы.** Выявленная корреляция между низким количеством Т-лимфоцитов в периферической крови больных и прогрессированием основного заболевания на фоне вакцинотерапии позволяет рассматривать низкий уровень Т-клеток как фактор неблагоприятного прогноза, а в сочетании с низким значением ИРИ может служить противопоказанием для вакцинотерапии. Безрецидивное течение заболевания в процессе вакцинотерапии наблюдалось у больных не имеющих нарушений ни в количестве Т-клеток ни в соотношении субпопуляций CD4+ и CD8+ лимфоцитов.

УДК 615.012:547.915:615.831]:616-006

Н.Ю. Кульбачевская, Е.В. Санарова, О.И. Коняева, Н.П. Ермакова, В.М. Бухман, А.В. Ланцова,  
А.П. Полозкова, О.Л. Орлова, Н.А. Оборотова

### ИЗУЧЕНИЕ «ОСТРОЙ» ТОКСИЧНОСТИ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ТИОСЕНСА

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

#### Контактная информация

Санарова Екатерина Викторовна, к. фарм.н., старший научный сотрудник лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДнТО

адрес: 115478 Москва, Каширское шоссе, 24; тел.: +7(499)612-81-92

e-mail: sanarova8686@mail.ru

Статья поступила 15.05.2015, принята к печати 10.08.2015

#### Резюме

В лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ разработана ЛЛЛФ нового инфракрасного фотосенсибилизатора производного фталоцианина – Тиосенса. На предыдущих этапах исследований подобран оптимальный состав лекарственной формы, отработана технология ее получения и разработаны методики анализа, проведен ряд биологических экспериментов. Следующим этапом при проведении доклинических исследований является изучение «острой» токсичности созданной ЛЛЛФ, которому и посвящена данная статья.

Исследование «острой» токсичности ЛЛЛФ Тиосенса проведено в лаборатории фармакологии и токсикологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ. При изучении «острой» токсичности ЛЛЛФ Тиосенса проводили эксперименты на мышах-гибридах F<sub>1</sub>(CBA × C<sub>57</sub>Bl/6j) самцах и самках и неинбредных крысах-самцах. В первой серии опытов ЛЛЛФ Тиосенса вводили мышам-самцам в диапазоне доз 5; 10; 20 и 30 мг/кг. Во второй серии опытов ЛЛЛФ Тиосенса вводили мышам самцам и самкам в диапазоне доз 6; 12 и 24 мг/кг.

В опытах на мышах-самцах, получавших ЛЛЛФ Тиосенса в/в в дозах 5 и 10 мг/кг, внешние проявления токсичности отсутствовали, в дозах 20 и 30 мг/кг – наблюдали гибель всех подопытных животных в первые сутки после введения от гиподинамии и пилоэрекции. Во второй серии опытов установлено отсутствие половых различий при однократном в/в введении ЛЛЛФ Тиосенса мышам. В результате проведенных исследований по «острой» токсичности на крысах показано, что при введении ЛЛЛФ Тиосенса в дозах 3; 6 и 9 мг/кг гибели животных не отмечалось. Однократное внутривенное введение ЛЛЛФ Тиосенса крысам в диапазоне доз, превышающих предполагаемую дозу для применения человеку в 1,5–4,5 раза, хорошо переносится животными: их гибель, клинические проявления токсичности и изменения в поведенческих реакциях отсутствуют.

**Ключевые слова:** Тиосенс, липосомальная лекарственная форма, токсичность.

*N. Yu. Kulbachevskaya, E. V. Sanarova, O. I. Konyeva, N. P. Ermakova, V. M. Buchman, A. V. Lantsova,  
A. P. Polozkova, O. L. Orlova, N. A. Oborotova*

### STUDY OF THE «ACUTE» TOXICITY OF LIPOSOMAL DRUG FORM OF ANTINEOPLASTIC PHOTOSENSITIZER THIOSENS

FSBI «N.N. Blokhin RCRC», Moscow

#### Abstract

The laboratory for development of drug forms, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center developed a lyophilized liposomal dosage form (LLDF) of a new infrared photosensitizer phthalocyanine derivative – Thiosens. Previous studies determined optimal composition of the dosage form, technology of its production and methods of analysis; a number of biological experiments were performed. The next step of preclinical research is studying "acute" toxicity of LLDF, which is presented in this paper.

The study of "acute" toxicity of LLDF Thiosens was carried out in the laboratory of Pharmacology and Toxicology. "Acute" toxicity of LLDF Thiosens was studied in the experiments on mice hybrids F<sub>1</sub> (CBA × C<sub>57</sub>Bl/6J) male and female and weinbrener outbred male rats. In the first series of experiments LLDF Thiosens was administered to male mice in the dose range of 5; 10; 20 and 30 mg/kg. In the second series of experiments, male and female mice were injected with LLDF Thiosens in the dosage range 6; 12 and 24 mg/kg.

Male mice were treated by LLDF Thiosens intravenously; no symptoms of toxicity were registered at the doses of 5 and 10 mg/kg; death was observed in all experimental animals after administration at the doses of 20 and 30 mg/kg on the first day in the result of inactivity and piloerection. In the second series of experiments no sex differences were found in single intravenous injection of LLDF Thiosens. The results of the studies of "acute" toxicity in rats demon-

strated that when LLDF Thiosens was administered in doses 3, 6 and 9 mg/kg animal deaths were reported. A single intravenous LLDF Thiosens administration in rats in the excess of the expected dose for human in 1.5–4.5 times was well tolerated by the animals: animal mortality, clinical signs of toxicity and changes in behavioral responses were absent.

**Key words:** Thiosens, liposomal dosage form, toxicity.

### Введение

В современной онкологии особое место занимает метод фотодинамической терапии, основанный на способности ФС селективно накапливаться в ткани опухоли и при локальном воздействии лазерного облучения определенной длины волны генерировать образование синглетного кислорода и активных радикалов, оказывающих повреждающее действие на опухолевые клетки [4; 17]. Одним из технологических направлений, способствующих повышению эффективности и снижению проявления побочных эффектов данного метода лечения злокачественных новообразований, является создание липосомальных систем доставки ФС [5; 6]. Применение липосомальных носителей обеспечивает устойчивость препарата при хранении и введении в организм, низкую темновую токсичность, высокую селективность накопления в опухолях по сравнению с окружающими нормальными тканями и быстрое выведение из организма [1–3; 8–10; 18].

В настоящее время продолжается поиск новых ФС с улучшенными терапевтическими свойствами, поглощающих свет в ближней инфракрасной области (720–850 нм) и характеризующихся более высоким квантовым выходом генерации синглетного кислорода и свободных радикалов. К таким ФС относится тетра-3-фенилтиофталоцианин-гидроксиалюминия (Тиосенс), синтезированный в ФГУП ГНЦ «НИОПИК» и имеющий максимум поглощения при  $717 \pm 4$  нм [20; 22]. Данное вещество проявляет гидрофобные свойства, поэтому инкапсуляция его в липосомы не только позволяет вводить препарат внутривенно *in vivo*, но также улучшает фармакокинетический профиль препарата. В исследованиях, проведенных в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, выявлено, что Тиосенс в составе липосомальной лекарственной формы обладает достаточно высокой селективностью накопления в опухоли по отношению к нормальной ткани и фотодинамическая терапия с его использованием вызывает высокий противоопухолевый эффект [7; 13; 19; 21].

В связи с тем, что необходимым этапом разработки нового лекарственного средства является изучение его безвредности, цель настоящего исследования состояла в доклиническом изучении «острой» токсичности ЛЛДФ Тиосенса на мелких лабораторных животных при рекомендованном в клинику внутривенном введении.

### Материалы и методы

#### Технология получения и анализ ЛЛДФ Тиосенса

При получении серий ЛЛДФ Тиосенса с целью проведения исследований по изучению «острой» токсичности использовали «пленочный» метод формирования липосом с модификацией для гидрофобных субстанций. Ингредиенты липосомального бислоя – лецитин Е РС S (Lipoid, Германия), холестерин (Sigma, Япония), ПЭГ-2000-дистеароилфостфатидилэтаноламин PEG-2000-DSPE (Lipoid, Германия) растворяли в хлороформе. Субстанцию Тиосенса также растворяли в хлороформе и помещали в УЗ-ванну на 5–10 мин, а затем добавляли к раствору липидов. Полученный раствор фильтровали через нейлоновые фильтровальные мембраны Pall (ООО Палл Евразия, Россия) с размером пор фильтра 0,22 мкм и переносили в круглодонную колбу. Растворитель отгоняли при температуре выше температуры фазового перехода лецитина (+ 37 °С) на роторном испарителе BÜCHI Rotavapor R-200 (BÜCHI Labortechnik AG, Швейцария) до формирования однородной полупрозрачной липидной пленки. Полученную пленку сушили под вакуумом до полного удаления органического растворителя, а затем гидратировали водой для инъекций. В результате получали дисперсию мультиламеллярных (многослойных) липосом, которую фильтровали на экструдере LIPEX™ (Northern Lipids, Inc.; Lipex Biomembranes, Inc., Канада) через нейлоновые фильтровальные мембраны Pall с размером пор 1,2 мкм и измельчали с целью получения дисперсии моноламеллярных (однослойных) липосом на гомогенизаторе высокого давления Microfluidizer M-110S (Microfluidics, США). После чего измельченную дисперсию фильтровали последовательно через нейлоновые фильтровальные мембраны Pall с размером пор 0,45 и 0,22 мкм. Так как в водной дисперсии липосомы нестабильны и проявляют тенденцию к слиянию и увеличению размеров, для получения лекарственной формы с необходимым сроком хранения проводили лиофильную сушку с добавлением в качестве криопротектора сахарозы (Химмед, Россия) в нужной концентрации [11; 15; 16].

На всех стадиях получения липосом производили измерение размера везикул на наносайзере Nicomp 380 Submicron Particle Sizer (Particle Sizing Systems, США), значения pH липосомальной дисперсии на pH-метре HANNA pH 211 (Hanna Instruments, Германия) и количества включенного препарата, согласно разработанной спектрофотометрической методики с помощью спектрофотометра Cary-100 (Varian, Inc., Австралия [12; 14]). После получения ЛЛДФ Тиосенса анализировали по всем необходимым параметрам.

#### Методика изучения

#### «острой» токсичности ЛЛДФ Тиосенса

В опытах по изучению «острой» токсичности, которые были проведены в лаборатории фар-

макологии и токсикологии, использовали серии ЛЛЛФ Тиосенса, полученные в лаборатории разработки лекарственных форм и стандартизованные в лаборатории химико-фармацевтического анализа НИИ ЭДнТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ.

В опытах по изучению «острой» токсичности использовано 55 здоровых мышей-самцов, 25 мышей-самок гибридов (СВА×С<sub>57</sub>В1/6J)F<sub>1</sub> массой 19–23 г и 85 неинбредных крыс-самцов массой 250–300 г, полученных из разведения ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ. В опытах использованы клинически здоровые животные, находившиеся в одинаковых условиях содержания и кормления.

ЛЛЛФ Тиосенса с содержанием во флаконе 1,5 мг действующего вещества растворяли в 3 мл воды для инъекций и вводили мышам внутривенно в диапазоне доз 5 мг/кг; 6 мг/кг; 10 мг/кг; 12 мг/кг; 20 мг/кг; 24 мг/кг и 30 мг/кг. Введение ЛЛЛФ Тиосенса в дозах 20; 24 и 30 мг/кг (при рекомендуемой концентрации 1,5 мг в 3 мл воды) было лимитировано максимальным объемом вводимого раствора при фиксированной концентрации. В связи с этим препарат вводили 2- и 3-кратно соответственно, с интервалом 2 ч между введениями. Крысам препарат вводили в дозах 3 мг/кг; 6 мг/кг и 9 мг/кг. Подбор доз для исследований проводили исходя из предполагаемой дозы ЛЛЛФ Тиосенса для человека. Пересчет доз осуществляли с использованием коэффициентов поверхности тела животных и человека по методу Freireich.

Критериями оценки «острой» токсичности ЛЛЛФ Тиосенса служили: число павших и сроки гибели животных, клиническая картина интоксикации, поведенческие реакции и данные аутопсии павших и умерщвленных в конце опыта животных (макроскопическая оценка). Длительность наблюдения за животными после однократного введения ЛЛЛФ Тиосенса составляла 30 дней. По окончании исследования мыши и крысы подвергались умерщвлению методом усыпления эфиром. В течение всего срока наблюдения ежедневно следили за характером стула, изменением массы тела животных, состоянием глаз, носа, изменением дыхания, подвижности, аппетита, состоянием шерстного покрова, оценивали потребление воды. Большое внимание уделяли поведенческим реакциям животных.

## Результаты и обсуждение

### *Изучение «острой» токсичности ЛЛЛФ Тиосенса при однократном внутривенном введении мышам*

При изучении «острой» токсичности ЛЛЛФ Тиосенса на мышах проводили две серии опытов. В первой ЛЛЛФ Тиосенса вводили мышам-самцам в диапазоне доз 5 мг/кг; 10 мг/кг; 20 мг/кг и 30 мг/кг. Во второй ЛЛЛФ Тиосенса вводили мышам самцам и самкам в диапазоне доз 6 мг/кг; 12 мг/кг и 24 мг/кг.

В результате проведенных исследований по изучению «острой» токсичности в первой серии

опытов показано, что при введении ЛЛЛФ Тиосенса в дозах 20 мг/кг и 30 мг/кг наступала 100 %-ная гибель мышей на 1 сутки опыта. Животные погибали на фоне выраженной гиподинамии и пилоэрекции. На вскрытии павших животных отмечено: окрашивание печени и селезенки в зеленый цвет, сердце в систоле, селезенка увеличена в 2–2,5 раза, у некоторых животных в легких наблюдались участки опеченения. У мышей, получавших ЛЛЛФ Тиосенса в дозах 5 и 10 мг/кг, гибели животных и каких-либо внешних проявлений токсичности и изменений в поведенческих реакциях не отмечено (табл. 1).

В результате проведенных исследований по изучению «острой» токсичности во второй серии опытов показано, что количественная токсичность ЛЛЛФ Тиосенса для самцов и самок одинакова. ЛЛЛФ Тиосенса в дозе 24 мг/кг вызвала гибель 17 % мышей-самок и 17 % мышей-самцов (табл. 2). Животные погибали на фоне снижения двигательной активности. На вскрытии павших животных отмечено: окрашивание печени, селезенки и брыжеечных лимфатических узлов в зеленый цвет, сердце в систоле, остальные органы без особенностей. У выживших животных наблюдалось дозозависимое окрашивание мочи в зеленоватый цвет в течение 1–3 суток после введения препарата.

Анализ изменения массы тела мышей после однократного в/в введения ЛЛЛФ Тиосенса показал, что масса тела животных изменялась в пределах физиологических колебаний, характерных для данного вида животных (табл. 3).

На вскрытии умерщвленных в конце опыта животных отмечено незначительное дозозависимое окрашивание в голубовато-зеленый цвет печени, брыжеечных лимфатических узлов и селезенки, остальные органы без особенностей.

### *Изучение «острой» токсичности ЛЛЛФ Тиосенса при однократном внутривенном введении крысам*

В результате проведенных исследований по «острой» токсичности на крысах установлено, что при введении ЛЛЛФ Тиосенса во всех изученных дозах гибели животных не отмечалось (табл. 4). У крыс, непосредственно после введения ЛЛЛФ Тиосенса, независимо от дозы отмечалась незначительная заторможенность и адинамия, наблюдаемая в течение 10–15 мин.

При дальнейшем наблюдении препарат не оказывал влияния на общее состояние крыс, не вызывал внешних проявлений токсичности, не изменял поведенческие реакции животных. Крысы охотно поедали корм, сохраняли двигательную активность. У животных наблюдалось дозозависимое окрашивание мочи в зеленоватый цвет в течение 1–3 суток после введения препарата.

Масса тела крыс во всех изученных дозах изменялась в пределах физиологических колебаний, характерных для данного вида животных и не отличалась от показателей изменения массы тела контрольных животных (табл. 5).

Таблица 1

«Острая» токсичность ЛЛЛФ Тиосенса на мышах-самцах-гибридах (СВА×С<sub>57</sub>Вl/6j)F<sub>1</sub>

Доза ЛЛЛФ Тиосенса, мг/кг	Пало/всего животных	Сроки гибели животных, дни
5	0/6	–
10	0/6	–
20	6/6	1; 1; 1; 1; 1; 1
30	6/6	0; 0; 0; 1; 1; 1
Контроль	0/6	–

Таблица 2

«Острая» токсичность ЛЛЛФ Тиосенса на мышах гибридах (СВА×С<sub>57</sub>Вl/6j)F<sub>1</sub>

Доза ЛЛЛФ, мг/кг	Пол животных	Пало/всего ивотных	Сроки гибели, дни
24 мг/кг	♂	1/6	6
	♀	1/6	10
12 мг/кг	♂	0/6	–
	♀	0/6	–
6 мг/кг	♂	0/6	–
	♀	0/6	–
Контроль	♂	0/6	–
	♀	0/6	–

Таблица 3

Динамика изменения массы тела мышей-гибридов (СВА×С<sub>57</sub>Вl/6j) F<sub>1</sub> после однократного в/в введения ЛЛЛФ Тиосенса

Доза ЛЛЛФ, мг/кг	Масса тела животных на сутки после введения препарата, г					
	Фон (0)	3	7	14	21	30
Самцы						
5	22,2±1,3	24,1±0,8	24,7±0,6	25,7±0,7	26,17±0,9	27,6±0,9
6	22,6±1,3	24,0±1,4	25,2±1,1	27,0±1,5	27,9±1,4	29,7±2,6
10	23,3±1,0	24,3±0,9	24,1±1,3	24,2±0,7	25,4±1,0	26,2±0,8
12	24,6±1,8	24,8±1,2	25,5±1,1	27,4±2,0	28,5±1,7	30,7±2,9
24	24,2±2,0	23,2±1,9	24,1±1,8	25,8±1,4	26,6±1,3	27,9±1,4
Контроль	23,9±0,8	24,4±0,7	25,3±0,8	26,6±0,9	27,8±1,1	28,1±0,7
Самки						
6	20,3±1,1	20,2±1,0	21,5±0,9	22,7±2,1	23,3±1,8	24,2±1,7
12	20,4±1,6	20,7±1,0	21,7±1,2	22,8±0,8	23,5±0,9	24,3±0,6
24	20,2±1,4	19,4±1,8	21,5±2,1	21,6±1,4	22,4±1,3	23,3±1,3
Контроль	18,8±0,6	19,3±1,4	20,4±1,3	20,9±1,3	21,8±1,2	22,1±1,0

Таблица 4

«Острая» токсичность ЛЛЛФ Тиосенса на неинбредных крысах-самцах

Доза ЛЛЛФ Тиосенса, мг/кг	Пало/всего животных	Сроки гибели животных, дни
3	0/5	–
6	0/5	–
9	0/5	–
Контроль	0/5	–

Таблица 5

Динамика изменения массы тела неинбредных крыс-самцов после однократного в/в введения ЛЛЛФ Тиосенса

Доза ЛЛЛФ, мг/кг	Масса тела животных на сутки после введения препарата, г					
	Фон (0)	3	7	14	21	30
3	327,5±43,8	341,8±38,7	357,5±36,3	379,8±37,7	406,7±37,2	414,2±27,5
6	298,3±36,0	313,3±30,2	330,0±32,1	354,0±27,7	385,0±23,5	401,7±24,6
9	300,0±51,3	315,5±51,4	329,3±48,1	354,2±49,1	394,0±47,1	390,0±27,0
Контроль	381,7±25,6	386,0±24,4	405,3±25,1	425,8±25,6	459,8±18,8	452,2±27,2

### Заключение

Таким образом, изучена «острая» токсичность ЛЛЛФ Тиосенса при однократном внутривенном применении в диапазоне доз на мышах и крысах самках и самцах. При однократном внутривенном введении ЛЛЛФ Тиосенса мышам и крысам самцам и самкам по числу павших животных, срокам гибели, клинической картине интоксикации установлено отсутствие гендерных различий.

Однократное в/в введение ЛЛЛФ Тиосенса крысам в диапазоне доз, превышающих предполагаемую дозу для применения человеку в 1,5–4,5 раза, хорошо переносится животными: гибель животных, клинические проявления токсичности и изменения в поведенческих реакциях отсутствуют. Установлено, что при однократном в/в введении ЛЛЛФ Тиосенса мышам и крысам гибели животных не наблюдалось, в связи с этим расчетные токсические дозы препарата не установлены.

### Литература

1. Барышников А.Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов // Вестник РАМН. – 2012. – №3. – С. 23–30.
2. Грищенко Н.В., Барышникова М.А., Полозкова А.П. и др. Липосомальные противоопухолевые препараты не используют CD95-зависимый сигнальный путь апоптоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 37–42.
3. Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И., Ермакова Н.П. и др. Изучение «хронической» токсичности лиофилизированной липосомальной лекарственной формы тиосенса на крысах // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 30.
4. Меерович И.Г., Меерович Г.А., Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Распределение света по глубине опухолевого очага и эффективность использования терапевтического излучения при фотодинамической терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 3. – С. 93–7.
5. Меерович И.Г., Оборотова Н.А. Применение липосом в фотохимиотерапии: 1. Липосомы в ФДТ // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – № 4. – С. 3–8.
6. Меерович И.Г., Оборотова Н.А. Применение липосом в фотохимиотерапии: 2. Липосомальные формы для создания фотоактивируемых липосомальных препаратов в фотобиологических исследованиях // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 6–12.
7. Меерович И.Г., Санарова Е.В., Меерович Г.А. и др. Инфракрасные фотосенсибилизаторы на основе наноструктурированных форм производных фталоцианинов // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). – 2013. – Т. LVII, № 2. – С. 60–8.
8. Оборотова Н.А. Липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – Т. 35, № 5. – С. 32–58.
9. Оборотова Н.А. Направленная доставка противоопухолевых препаратов // Антибиотики и химиотерапия. – 1991. – Т. 36, № 10. – С. 47.
10. Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Липосомальные лекарственные формы в клинической онкологии // Успехи современной биологии. – 2009. – Т. 121, № 5. – С. 464.
11. Санарова Е.В., Полозкова А.П., Меерович И.Г. и др. Влияние технологических факторов на качество липосомальной лекарственной формы нового фотосенсибилизатора – тиосенса // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45, № 12. – С. 32–6.
12. Санарова Е.В., Полозкова А.П., Меерович И.Г. и др. Количественное определение тиосенса в новой липосомальной лекарственной форме // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Т. 46, № 6. – С. 54–6.

13. Санарова Е.В., Смирнова З.С., Полозкова А.П. и др. Биофармацевтические исследования новой липосомальной лекарственной формы Тиосенса // Биофармацевтический журнал. – 2011. – Т. 3, № 6. – С. 33–6.
14. Санарова Е.В., Оборотова Н.А., Смирнова З.С. и др. Химико-фармацевтическая и биологическая стандартизация липосомальной лекарственной формы противоопухолевого фотосенсибилизатора тиосенса // Биофармацевтический журнал. – 2013. – Т. 5, № 3. – С. 31–5.
15. Санарова Е.В., Смирнова З.С., Полозкова А.П. и др. Создание на основе липосомальных систем доставки лекарственной формы фталоцианинового фотосенсибилизатора тиосенса // Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. – 2013. – № 3. – С. 30–1.
16. Санарова Е.В., Оборотова Н.А., Смирнова З.С. и др. Применение липосомальных систем доставки для создания нового эффективного противоопухолевого фотосенсибилизатора // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 72.
17. Санарова Е.В., Ланцова А.В., Дмитриева М.В. и др. Фотодинамическая терапия – способ повышения селективности и эффективности лечения опухолей // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 109–18.
18. Санарова Е.В., Ланцова А.В., Оборотова Н.А. Липосомальные системы доставки лекарственных веществ: свойства и технологические особенности получения // Биофармацевтический журнал. – 2014. – Т. 6, № 4. – С. 3–13.
19. Смирнова З.С., Ермакова К.В., Кубасова И.Ю. и др. Эффективность фотодинамической терапии с отечественным фотосенсибилизатором тиосенсом на глиоме С6 крыс // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 49.
20. Смирнова З.С., Меерович И.Г., Лукьянец Е.А. и др. Фенилтиозамещенные фталоцианины – новые фотосенсибилизаторы ближнего инфракрасного диапазона. // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 54–60.
21. Смирнова З.С., Борисова Л.М., Киселева М.П., и др. Фармакокинетические исследования тиосенса на перевиваемой опухоли Эрлиха мышей // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 76.
22. Meerovich I.G., Sanarova E.V., Meerovich G.A. et al. Near-Infrared Photosensitizers based on Nanostructured Forms of Phthalocyanine Derivatives // Russian Journal of General Chemistry. – 2015. – 85(1). – P. 280–8.

УДК 616-006.3.04-092.9:615.832.3

М.А. Каплан<sup>1</sup>, А.И. Малыгина<sup>1</sup>, Г.В. Пономарев<sup>2</sup>, А.А. Михайловская<sup>1</sup>,  
В.В. Дрожжина<sup>1</sup>, Л.М. Архипова<sup>1</sup>, Ю.С. Осипчук<sup>1</sup>

### ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОР ЛИПОСОМАЛЬНЫЙ АМИДОАМИНХЛОРИН ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ САРКОМЫ М-1 КРЫС

<sup>1</sup>Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России, Обнинск

<sup>2</sup>ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Москва

#### Контактная информация

Каплан Михаил Александрович, профессор, заведующий отделом фотодинамической диагностики и терапии

адрес: 249036 Калужская область, г. Обнинск, ул. Королева, 4; тел. +7(48439)9-30-26

e-mail: [kaplan@mrgc.obninsk.ru](mailto:kaplan@mrgc.obninsk.ru)

Статья поступила 04.09.2014, принята к печати 10.0.2015.

#### Резюме

В эксперименте на модели опухоли саркома М-1 изучена эффективность липосомального амидоаминхлорина как нового фотосенсибилизатора (ФС) при проведении ФДТ. Цель исследования: определить параметры минимально эффективной дозы ФС и лазерного излучения для достижения полной регрессии опухоли. Изучали динамику накопления ФС в опухоли и здоровой ткани для определения времени проведения ФДТ и противоопухолевую эффективность разных доз ФС и различных параметров лазерного излучения. В результате проведенного исследования определен оптимальный срок проведения ФДТ и установлены минимально эффективная доза ФС и параметры лазерного излучения.

**Ключевые слова:** саркома, липосомальный фотосенсибилизатор, лазер, динамика накопления.

M.A. Kaplan<sup>1</sup>, A.I. Malygina<sup>1</sup>, G.V. Ponomarev<sup>2</sup>, A.A. Mikhailovskaya<sup>1</sup>,  
V.V. Drozhzhina<sup>1</sup>, L.M. Arkhipova<sup>1</sup>, J.S. Osipchuk<sup>1</sup>

### LIPOSOMAL PHOTSENSITIZER AMIDOAMINCHLORINE FOR PHOTODYNAMIC THERAPY OF RAT SARCOMA M-1

<sup>1</sup>A.F. Tsyb Medical Radiological Center of Science, Obninsk

<sup>2</sup>V.N. Orekhovich Institute of biomedical chemistry, Moscow

#### Abstract

Effectiveness of a new photosensitizer (PS) liposomal amidoaminchlorine for PDT was studied on a tumor model of rat sarcoma M-1. The research objective: to define parameters of PS minimum effective dose and laser irradiation to achieve complete regression of the tumor. Dynamics of PS accumulation in tumor and healthy tissue was studied to define the PDT time course and antitumor efficiency of different PS doses and various parameters of laser irradiation. The study results defined the optimum term for PDT and minimally effective PS dose and established the parameters for laser irradiation.

**Keywords:** sarcoma, liposomal photosensitizer, laser, dynamics of accumulation.

#### Введение

Фотодинамическая терапия – направление противоопухолевой терапии, в котором воздействие на ткань опухоли введенного фотосенсибилизатора инициируется световым излучением, поглощаемым этим фотосенсибилизатором [5; 7; 8; 14; 15; 19; 21].

В опухоли начинается фотохимическая реакция с образованием синглетного кислорода и свободных кислотных радикалов, оказывающих токсическое воздействие на опухолевые клетки.

Кроме прямого цитотоксического воздействия ФДТ на опухолевые клетки, важную роль в деструкции новообразования играют:

- нарушение кровоснабжения за счет повреждения эндотелия кровеносных сосудов опухолевой ткани;
- цитокиновые реакции, обусловленные стимуляцией продукции ФНО, активацией макрофагов, лейкоцитов и лимфоцитов.

Одной из основных задач современной онкологии является разработка новых противоопухолевых препаратов, обеспечивающих максимальное разрушение опухоли при минимальном повреждении нормальных клеток и тканей организма. В течение последнего десятилетия в ФДТ злокачественных новообразований большой интерес в качестве ФС вызывают производные ряда хлорофилла

[13; 22], а также ведутся активные работы по созданию липосомальных форм ФС, которые увеличивают эффективность ФДТ [1–4; 6; 9–12; 17; 18; 20]. Поэтому актуальной задачей является синтез препарата амидоаминхлорина (рис. 1) и разработка его новой липосомальной лекарственной формы.

Амидоаминхлорин разработан на основе взаимодействия метилфеофорбида *a* с различными первичными аминами и является химической модификацией периферических заместителей хлорина еб. Один из пиков поглощения находится на волне 662 нм, что коррелирует с высоким квантовым выходом синглетного кислорода. Концентрация фотосенсибилизатора в PBS (фосфатном буфере при pH 7,2–7,4) составляет 1,0 мг в 1 мл. Для получения водных растворов поступали следующим образом:

1. Навески хлорина и ФХ растворяли в хлороформе и рассчитанные объёмы хлороформных растворов смешивали, чтобы получить раствор конъюгат/ФХ в соотношении 1 : 5 (моль/моль).
2. Смешанные растворы упаривали досуха и растворяли в изопропанолу при 60 °С для получения стокового раствора
3. Аликвоту нагретого изопропанольного раствора впрыскивали в 10 мл PBS при +60 °С и встряхивании.

В эксперименте использовался амидоаминхлорин еб моноадипинат в виде липосом из ФХ для создания водорастворимой формы в виде частиц размером до 200 нм и с концентрацией основного вещества – фотосенсибилизатора амидохлорина еб – 1,0 мг/мл водного раствора. Характерной особенностью хлорина еб является тот факт, что в зависимости от растворителя его спектральные характеристики сильно варьируют. Так, известно, что в водных средах его максимум поглощения смещается от 662 нм в коротковолновую область. Для экспериментальных исследований можно применять раствор в водном димексиде для внутрибрюшинного введения. В электронных спектрах водных липосомальных растворов наблюдались два основных пика: в области полосы Сорс при длине волны 400–402 нм и длинноволновый пик при длине волны 660–665 нм.

Амидоаминхлорин может быть переведен в липосомальную форму. В липосомальной форме в воде имеет максимум поглощения длине волны 665 нм (рис. 2).

**Цель работы** – определить минимально эффективную дозу ФС и параметров лазерного излучения для достижения полной регрессии опухоли у 100 % животных (срок наблюдения 21 сутки после ФДТ).

#### **Задачи исследования:**

1. изучить динамику накопления липосомального амидоаминхлорина в опухоли и здоровой ткани;
2. изучить противоопухолевую эффективность ФДТ саркомы М-1 при разных дозах ФС липосомального амидоаминхлорина и различных параметрах лазерного излучения.

## **Материалы и методы**

Исследования проведены на 102 беспородных крысах. В качестве экспериментальной модели опухоли использовали саркому М-1 крыс, которую перевивали под кожу в область бедра в виде кусочков опухоли донора. В опыт крыс брали на 7–9 день, когда опухоль достигала 0,7–1,0 см в  $\varnothing$ , шерстный покров депилировали. В качестве ФС использовали новый липосомальный амидоаминхлорин, который вводили внутрибрюшинно в разных дозах.

### **Изучение динамики накопления ФС в опухоли и здоровой ткани**

Для изучения динамики накопления препарат липосомальный амидоаминхлорин вводили крысам с саркомой М-1 внутрибрюшинно в дозе 2,5 мг/кг.

Уровень накопления ФС оценивали по интенсивности флуоресценции в условных единицах. Измерение уровня накопления ФС в опухолевой и здоровой тканях изучали с помощью спектрофлуоресцентного метода на комплексе ЛЭСА-01 «Биоспек», Россия. Датчики подводили к коже над опухолью и в 3 точках под прямым углом к объекту (центр, периферия 1 и периферия 2). Накопление в здоровой ткани определяли на здоровой ткани бедра с опухолью (контроль 1) и на противоположенном бедре (контроль 2). Перед измерением шерстный покров депилировали. Время экспозиции составляло 1–2 с. В различные сроки после введения ФС у каждого животного измеряли спектры опухолевой и здоровой тканей. Первое измерение проводили до введения препарата (0 ч), а затем через 20 мин; 1,0 ч; 1,5 ч; 3,0 ч; 4,0 ч и 5,5 ч.

Для суждения о селективности накопления ФС в опухоли по отношению к здоровой ткани рассчитывали индекс контрастности (опухоль/здоровая ткань).

### **Изучение параметров эффективной дозы ФС и лазерного излучения**

В опыт было взято 8 групп животных. ФДТ проводили с разными дозами ФС и различными параметрами лазерного излучения (плотность энергии (Е), плотность мощности (Ps)):

- 1 группа: доза ФС 1,0 мг/кг,  $E = 75$  Дж/см<sup>2</sup>,  $P_s = 0,34$  Вт/см<sup>2</sup>;
- 2 группа: доза ФС 0,5 мг/кг,  $E = 100$  Дж/см<sup>2</sup>,  $P_s = 0,34$  Вт/см<sup>2</sup>;
- 3 группа: доза ФС 0,75 мг/кг,  $E = 100$  Дж/см<sup>2</sup>,  $P_s = 0,34$  Вт/см<sup>2</sup>;
- 4 группа: доза ФС 1,0 мг/кг,  $E = 100$  Дж/см<sup>2</sup>,  $P_s = 0,34$  Вт/см<sup>2</sup>;
- 5 группа: доза ФС 1,25 мг/кг,  $E = 150$  Дж/см<sup>2</sup>,  $P_s = 0,34$  Вт/см<sup>2</sup>;
- 6 группа: доза ФС 1,25 мг/кг,  $E = 150$  Дж/см<sup>2</sup>,  $P_s = 0,51$  Вт/см<sup>2</sup>;
- 7 группа: доза ФС 2,5 мг/кг,  $E = 150$  Дж/см<sup>2</sup>,  $P_s = 0,51$  Вт/см<sup>2</sup>;
- 8 группа: доза ФС 2,5 мг/кг,  $E = 300$  Дж/см<sup>2</sup>,  $P_s = 0,51$  Вт/см<sup>2</sup>.

Контроль – крысы-опухоленосители без какого-либо воздействия.

В качестве контроля к эффективным дозам липосомального амидаминхлорина также были представлены результаты исследований нелипосомальной формы амидаминхлорина в тех же дозах ФС и параметрах лазерного излучения:

1. ФДТ (1,25 мг/кг, 150 Дж/см<sup>2</sup>, 0,51 Вт/см<sup>2</sup>);
2. ФДТ (2,5 мг/кг, 150 Дж/см<sup>2</sup>, 0,51 Вт/см<sup>2</sup>);
3. ФДТ (2,5 мг/кг, 300 Дж/см<sup>2</sup>, 0,51 Вт/см<sup>2</sup>).

Животные при облучении находились под общим тиопенталовым наркозом (внутрибрюшинно 2,5 % раствор в объеме 0,2 мл/100 г массы животного).

Источником лазерного излучения служил полупроводниковый лазерный аппарат «Аткус-2» производства ЗАО «Полупроводниковые приборы» (Санкт-Петербург) с длиной волны излучения 662±1 нм. Диаметр светового пятна составлял 1,5 см. Объем опухоли измеряли: до проведения ФДТ (V<sub>0</sub>) и на 3; 7; 10; 14 и 21 сутки (V<sub>t</sub>) после терапии. Эффективность ФДТ оценивали (по рекомендации Фармкомитета по предклинической апробации препаратов – по коэффициенту абсолютного прироста опухоли и по эффекту ингибирования роста опухоли) [16]:

Для вычисления коэффициента абсолютного прироста опухоли сначала определяли объемы опухолей по формуле:

$$V = \frac{1}{6} \pi \times d_1 \times d_2 \times d_3, \text{ где}$$

d<sub>1</sub>, d<sub>2</sub>, d<sub>3</sub> – три взаимно перпендикулярные диаметры опухоли,

V – объем опухоли в см<sup>3</sup>.

Коэффициент абсолютного прироста опухоли (K) рассчитывали по формуле:

$$K = \frac{V_t - V_0}{V_0}, \text{ где}$$

V<sub>0</sub> – объем опухоли до воздействия,

V<sub>t</sub> – объем опухоли на определенный срок наблюдения;

Торможение роста опухоли (ТРО %) вычисляли по формуле:

$$ТРО = \frac{V_k - V_o}{V_k} \times 100\%, \text{ где}$$

V<sub>k</sub> – средний объем опухоли в контрольной группе,

V<sub>o</sub> – средний объем опухоли в опытной группе.

Вычисляли процент животных в группе с полной регрессией (ПР %) опухоли, за которую принимали отсутствие видимой и пальпируемой опухоли.

**Статистическую обработку результатов исследований проводили в компьютерной про-**

грамме «Statistica» непараметрическими методами для независимых групп (описательная статистика, метод U теста Манна-Уитни).

## Результаты и обсуждение

### Изучение динамики накопления ФС в опухоли и здоровой ткани

Уровень и селективность накопления ФС в опухоли, а также скорость его выведения из нормальной ткани являются важнейшими характеристиками для ФДТ. Они влияют как на эффективность метода, так и на вероятность снижения побочных эффектов.

Из данных, представленных на рис. 3, видно, что в течение 5,5 ч после внутрибрюшинного введения липосомального амидаминхлорина в дозе 2,5 мг/кг происходит постепенное увеличение уровня накопления его как в опухоли, так и в здоровой ткани. Максимальный уровень накопления ФС в опухоли наблюдался через 4 – 5,5 ч после введения ФС. Что касается индекса контрастности, то самый высокий мы наблюдали через 4 ч.

Таким образом, оптимальное время проведения лазерного облучения после внутрибрюшинного введения липосомального амидаминхлорина в дозе 2,5 мг/кг наступает через 4 ч, когда имеем высокое накопление ФС в опухолевой ткани и когда индекс контрастности достигает своего максимального значения.

### Изучение параметров эффективной дозы ФС и лазерного излучения

В 1 группе при дозе ФС 1,0 мг/кг, E = 75 Дж/см<sup>2</sup> и Ps = 0,34 Вт/см<sup>2</sup> лазерного излучения на 21 сут после ФДТ полная регрессия наблюдалась у 25,0 % животных. У крыс с продолженным ростом отмечалось значительное снижение темпа прироста опухоли по сравнению с контролем и это снижение достоверно значимо (p<0,001; 3,90±2,60; в контроле 65,31±7,70). ТРО на 21 сут после ФДТ составляло 88 % (табл. 1).

Во 2 группе при снижении дозы ФС до 0,5 мг/кг, но при увеличении плотности энергии лазерного излучения до 100 Дж/см<sup>2</sup> (плотность мощности оставалась 0,34 Вт/см<sup>2</sup>) на 21 сут после ФДТ полная регрессия наблюдалась уже у 55,6 % животных, но ТРО составляло 71,4 %. Темп прироста у животных с продолженным ростом опухоли был выше, чем в группе 1, но по сравнению с контролем также достоверно ниже (19,60±9,08, p<0,003).

В 3 группе при увеличении дозы ФС до 0,75 мг/кг, при тех же параметрах лазерного излучения, как в группе 2 (100 Дж/см<sup>2</sup>, 0,34 Вт/см<sup>2</sup>) до 10 суток после ФДТ наблюдалась ПР опухоли у всех животных в группе. На 14 сут процент ПР опухоли снизился до 88,9 % и на 21 сут после ФДТ ПР наблюдалась только у 55,6 % животных. При данных параметрах проведения ФДТ отмечался хороший ингибирующий эффект (ТРО – 96,1 % при ПР 55,6 %). У крыс с продолженным ростом низкий темп прироста опухоли достоверно значим по сравнению с контролем (6,40±3,83, p<0,001).

Таблица 1

Динамика роста саркомы М-1 крыс после ФДТ при внутрибрюшинном введении липосомального амидамин-хлорина в разных дозах, при различной плотности энергии и плотности мощности лазерного излучения

№ гр	Схема проведения ФДТ	1. Объем опухоли (V) 3. Торможение роста опух. (ТРО %) 2. Коэффициент прироста опух. (К) 4. Полная регрессия опухоли (ПР %)				
		Сроки наблюдений				
		3сутки	7 сутки	10 сутки	14 сутки	21 сутки
1	1,0 мг/кг E=75 Дж/см <sup>2</sup> Ps=0,3Вт/см <sup>2</sup>	Полная регрессия опухоли у 100 % животных	0,047 ± 0,047 -0,78 ± 0,22* 98,0 88,9	0,364 ± 0,364 0,75 ± 1,75* 91,0 88,9	0,926 ± 0,868 3,57 ± 4,16* 87,6 55,6	0,644 ± 0,332 3,90 ± 2,60* 88,0 25,0
2	0,5 мг/кг E=100 Дж/см <sup>2</sup> Ps=0,34 Вт/см <sup>2</sup>	0,177 ± 0,102 -0,21 ± 0,47 70,9 66,7	0,260 ± 0,183 -0,08 ± 0,44* 88,8 55,6	0,601 ± 0,455 0,95 ± 1,04* 85,1 55,6	1,311 ± 0,880 3,95 ± 2,23* 82,5 55,6	3,945 ± 1,846 19,60 ± 9,08* 71,4 55,6
3	0,75 мг/кг E=100 Дж/см <sup>2</sup> Ps=0,34 Вт/см <sup>2</sup>	Полная регрессия опухоли у 100 % животных			0,052 ± 0,052 -0,60 ± 0,40* 99,3 88,9	0,529 ± 0,529 6,40 ± 3,83* 96,1 55,6
4	1,0 мг/кг E=100 Дж/см <sup>2</sup> Ps=0,34 Вт/см <sup>2</sup>	Полная регрессия опухоли у 100 % животных		0,005 ± 0,005 -0,95 ± 0,05* 99,9 93,8	0,043 ± 0,043 -0,51 ± 0,49* 99,4 93,8	0,484 ± 0,422 2,79 ± 3,59* 96,5 87,5
5	1,25 мг/кг E=150 Дж/см <sup>2</sup> Ps=0,34 Вт/см <sup>2</sup>	Полная регрессия опухоли у 100 % животных				0,010 ± 0,010 -0,85 ± 0,15* 99,0 88,9
6	1,25 мг/кг E=150 Дж/см <sup>2</sup> Ps=0,51 Вт/см <sup>2</sup>	Полная регрессия опухоли у 100 % животных				
7	2,5 мг/кг E=150 Дж/см <sup>2</sup> Ps0,51 Вт/см <sup>2</sup>	Полная регрессия опухоли у 100 % животных				
8	2,5 мг/кг E=300 Дж/см <sup>2</sup> Ps=0,51 Вт/см <sup>2</sup>	Полная регрессия опухоли у 100 % животных				
	Контроль (V, K)	0,609 ± 0,064 2,52 ± 0,51	2,324 ± 0,254 13,37 ± 2,57	4,030 ± 0,534 19,38 ± 2,23	7,495 ± 1,196 34,33 ± 4,27	13,787 ± 1,543 65,31 ± 7,70
*p<0,050 результаты достоверно значимы по сравнению с контролем.						

Таблица 2

Динамика роста саркомы М-1 крыс после ФДТ при внутрибрюшинном введении амидоаминхлорина в разных дозах, при различной плотности энергии и плотности мощности лазерного излучения

№ гр	Схема проведения ФДТ	1. Объём опухоли (V) 4. Полная регрес. опух (ПР %) 2. Коэффициент прироста опух. (К) 3. Торможение роста опух. (ТРО %) 5. Уровень значимости (p)				
		Сроки наблюдений				
		3сутки	7 сутки	10 сутки	14 сутки	21 сутки
1.	1,25 мг/кг E=150 Дж/см <sup>2</sup> Ps=0,51 Вт/см <sup>2</sup>	Полная регрессия опухоли у 100 % животных	0,046 ± 0,035 -0,39 ± 0,45* 98,0 62,5	0,088 ± 0,051 0,16 ± 0,67* 97,7 62,5	0,332 ± 0,182 3,16 ± 2,38* 95,6 50,0	1,035 ± 0,453 11,88 ± 6,07* 92,5 50,0
2.	2,5 мг/кг E=150 Дж/см <sup>2</sup> Ps=0,51 Вт/см <sup>2</sup>	Полная регрессия опухоли у 100 % животных		0,006 ± 0,006 -0,80 ± 0,20* 99,8 87,5	0,083 ± 0,039 -0,01 ± 0,50* 98,9 50,0	0,288 ± 0,144 3,79 ± 2,68* 97,9 50,0
3.	2,5 мг/кг E=300 Дж/см <sup>2</sup> Ps=0,51 Вт/см <sup>2</sup>	Полная регрессия опухоли у 100 % животных				
Контроль (V, K)		0,627 ± 0,055 2,97 ± 0,50	2,287 ± 0,204 14,01 ± 2,05	3,858 ± 0,433 20,73 ± 2,04	7,461 ± 1,014 36,00 ± 3,85	13,787 ± 1,543 65,31 ± 7,70

\*p<0,050 результаты достоверно значимы по сравнению с контролем

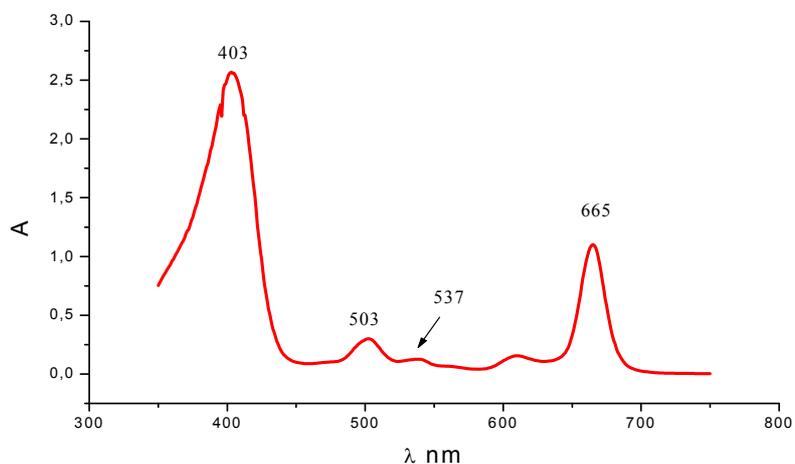
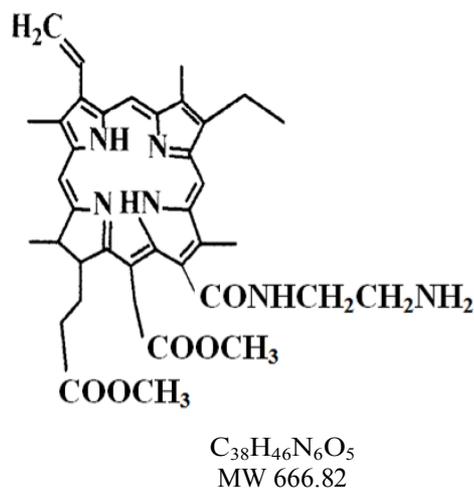


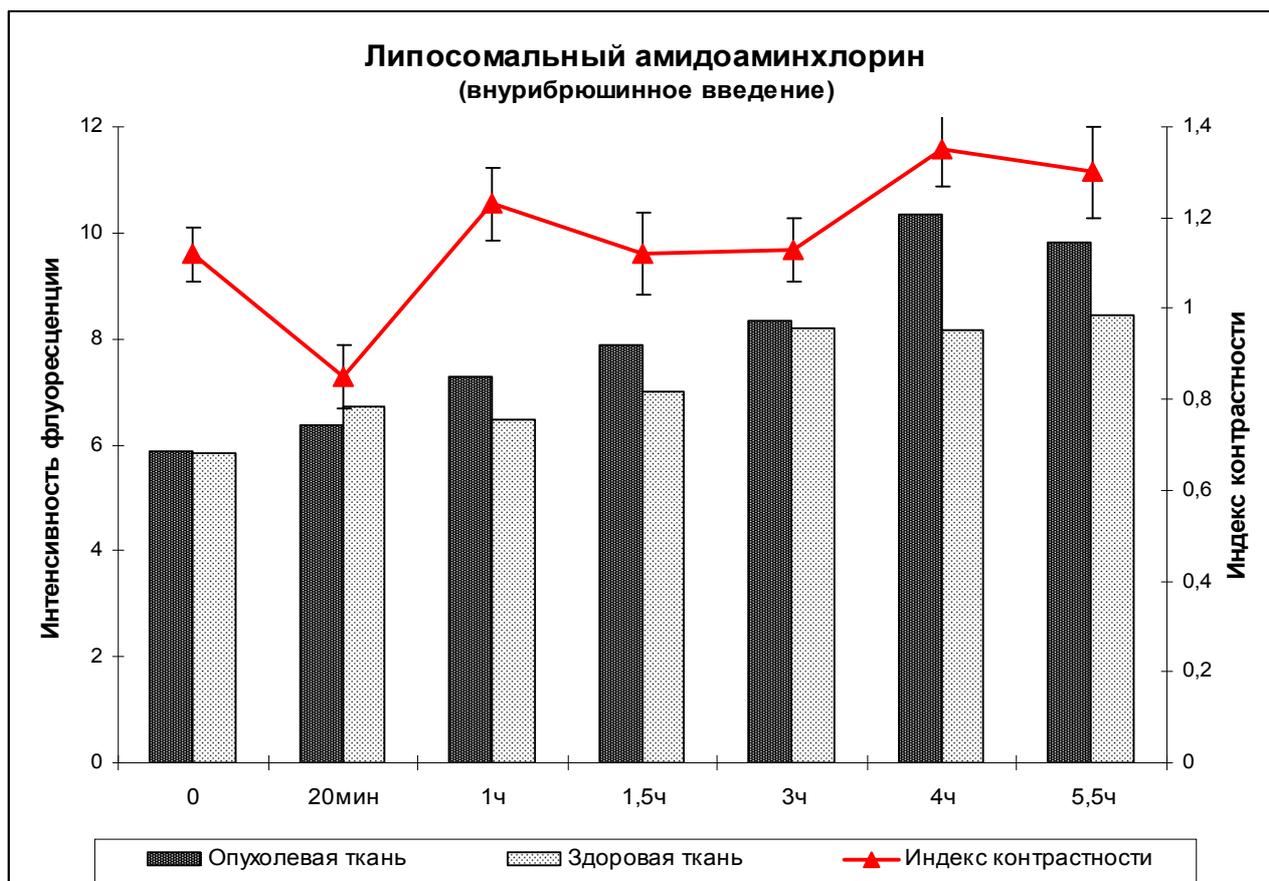
Рис. 1. Формула ФС амидоаминхлорина.

Рис. 2. Спектр поглощения амидоаминхлорина (A – оптическая плотность).

В 4 группе при увеличении дозы ФС до 1,0 мг/кг, при тех же параметрах лазерного излучения (100 Дж/см<sup>2</sup>, 0,34 Вт/см<sup>2</sup>) до 7 сут после ФДТ наблюдалась полная регрессия опухоли у всех животных в группе. На 10–14 сут после ФДТ лишь у 1 крысы отмечался рост опухоли, на 21 сут после ФДТ рост опухоли – у 2 крыс. На данный срок исследования наблюдался значительный ингибирующий эффект (ТРО – 96,5 % при ПР – 87,5 %). Коэффициент абсолютного прироста опухоли достоверно ниже, чем в контроле (2,79±3,59, p<0,001).

В 5 группе при увеличении дозы ФС до 1,25 мг/кг и увеличении плотности энергии лазерного излучения до 150 Дж/см<sup>2</sup>, при той же плотности мощности 0,34 Вт/см<sup>2</sup> (как в предыдущих исследованиях) до 14 сут после ФДТ наблюдалась полная регрессия опухоли у всех животных в группе.

На 21 сут исследования при данных параметрах проведения терапии ингибирующий эффект еще более значительный, чем в группе 4 (ТРО – 99,0 %, ПР – 88,9 %).



**Рис. 3.** Уровень накопления и индекс контрастности липосомального амидоаминхлорина в опухоли и здоровой ткани крыс с саркомой М-1.

В 6 группе при увеличении плотности мощности до  $0,51 \text{ Вт/см}^2$  (при той же дозе ФС  $1,25 \text{ мг/кг}$  и плотности энергии  $150 \text{ Дж/см}^2$ , как в группе 5) до 21 суток после ФДТ отмечалась полная регрессия опухоли у всех животных в группе.

Группы 7 и 8 были включены в работу для сравнения (нелипосомальная форма амидоаминхлорина).

В 7 группе при увеличении дозы ФС до  $2,5 \text{ мг/кг}$  при той же плотности энергии и плотности мощности ( $150 \text{ Дж/см}^2$ ,  $0,51 \text{ Вт/см}^2$ ) до 21 сут после ФДТ также наблюдалась полная регрессия опухоли у всех животных в группе.

В 8 группе при той же дозе ФС  $2,5 \text{ мг/кг}$  и плотности мощности  $0,51 \text{ Вт/см}^2$ , но при увеличении плотности энергии лазерного излучения до  $300 \text{ Дж/см}^2$  мы получили тот же результат – полная регрессия опухоли у всех животных в группе.

Таким образом, противоопухолевый эффект внутрибрюшинного введения липосомального амидоаминхлорина до 21 суток после ФДТ получен при всех исследуемых дозах ФС ( $0,5$ ;  $0,75$ ;  $1,0$ ;  $1,25$  и  $2,5 \text{ мг/кг}$ ) и параметрах лазерного облучения (плотность энергии  $100$ ;  $150$ ;  $300 \text{ Дж/см}^2$  и плотность мощности  $0,34$  и  $0,51 \text{ Вт/см}^2$ ).

При увеличении дозы ФС, плотности энергии и плотности мощности лазерного излучения

повышалась противоопухолевая эффективность ФДТ. Значительный ингибирующий эффект (ТРО – у  $99,0 \%$  и ПР – у  $88,9 \%$  животных) наблюдался уже при дозе ФС  $1,0 \text{ мг/кг}$ ,  $E = 100 \text{ Дж/см}^2$  и  $Ps = 0,34 \text{ Вт/см}^2$  лазерного излучения.

Полная регрессия опухоли у  $100 \%$  животных до 21 сут после ФДТ отмечали при использовании липосомального амидоаминхлорина в дозе ФС  $1,25 \text{ мг/кг}$ ,  $E = 150 \text{ Дж/см}^2$  и  $Ps = 0,51 \text{ Вт/см}^2$ .

При сравнении результатов исследования с нелипосомальной формой амидоаминхлорина полная регрессия опухоли достигнута лишь при дозе ФС  $2,5 \text{ мг/кг}$ ,  $E = 300 \text{ Дж/см}^2$  и  $Ps = 0,51 \text{ Вт/см}^2$  лазерного облучения (табл. 2), что подтверждает эффективность липосомальной формы амидоаминхлорина.

### Заключение

Минимально эффективная доза ФС и параметры лазерного излучения, приводящие к полной регрессии саркомы М-1 у  $100 \%$  животных до 21 сут исследования после ФДТ, составляли  $1,25 \text{ мг/кг}$  массы животного (внутрибрюшинно), плотность энергии лазерного излучения  $150 \text{ Дж/см}^2$ , плотность мощности  $0,51 \text{ Вт/см}^2$ .

## Литература

1. Барышников А.Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов // Вестник РАМН. – 2012. – № 3. – С. 23–30.
2. Барышникова М.А., Зангиева М., Барышников А.Ю. Взаимодействие липидных капсул с клеткой // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 11–5.
3. Грищенко Н.В., Барышникова М.А., Полозкова А.П. и др. Липосомальные противоопухолевые препараты не используют CD95-зависимый сигнальный путь апоптоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 37–42.
4. Дмитриева М.В., Санарова Е.В., Полозкова А.П. и др. Анализ липосомальной лекарственной формы нового фотосенсибилизатора хлоринового ряда // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 28.
5. Корчагина К.С., Гамаюнов С.В., Каров В.А. и др. Прогностическое значение параметров флюоресценции при фотодинамической терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 100.
6. Матюшин А.А., Барышникова М.А., Барышников А.Ю., Караулов А.В. Липосомы: организм, опухоль, клетка // Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. – 2013. – Т. 17, № 6. – С. 3–10.
7. Меерович И.Г., Казачкина Н.И., Савицкий А.П. Изучение проявлений фотоиммунного отклика при фотодинамической терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 110.
8. Меерович И.Г., Меерович Г.А., Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Распределение света по глубине опухолевого очага и эффективность использования терапевтического излучения при фотодинамической терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 3. – С. 93–7.
9. Меерович И.Г., Оборотова Н.А. Применение липосом в фотохимиотерапии: 1. Липосомы в ФДТ // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – № 4. – С. 3–8.
10. Меерович И.Г., Оборотова Н.А. Применение липосом в фотохимиотерапии: 2. Липосомальные формы для создания фотоактивируемых липосомальных препаратов в фотобиологических исследованиях // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, №1. – С. 6–12.
11. Оборотова Н.А. Липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – Т. 35, № 5. – С. 32–58.
12. Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Липосомальные лекарственные формы в клинической онкологии // Успехи современной биологии. – 2009. – Т. 121, № 5. – С. 464.
13. Пономарев Г.В. Перспективы создания фотосенсибилизаторов на основе природного хлорофилла А // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 1. – С. 24.
14. Пономарев Г.В., Егоров С.Ю., Стрижаков А.А. и др. Фотогенерация синглетного кислорода фотосенсибилизаторами тетрапиррольного ряда в связи с проблемами фотодинамической терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 68.
15. Романко Ю.С., Цыб А.Ф., Каплан М.А., Попучиев В.В. Зависимость противоопухолевой эффективности фотодинамической терапии от плотности световой энергии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т. 139, № 4. – С. 456–61.
16. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств // М. – Гриф и К. – 2012. – Часть 1. – С. 650–651; 655–669.
17. Санарова Е.В., Оборотова Н.А., Смирнова З.С. и др. Применение липосомальных систем доставки для создания нового эффективного противоопухолевого фотосенсибилизатора // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 72.
18. Смирнова З.С., Кубасова И.Ю., Макарова О.А. и др. Доклиническое изучение липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 40–5.
19. Стронатко Е.Ф. Основные этапы развития и современное состояние ФДТ в России // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 51.
20. Тазина Е.В., Костин К.В., Оборотова Н.А. Особенности инкапсулирования лекарственных препаратов в липосомы // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – № 8(45). – С. 30–40.
21. Филоненко Е.В. Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия в онкологии // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 85.
22. Чан Тхи Хай Иен, Г.В. Раменская, Н.А. Оборотова. Фотосенсибилизаторы хлоринового ряда в фотодинамической терапии опухолей // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 4. – С. 99–105.

Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты»

*И.Д. Гулякин, Е.В. Санарова, А.В. Ланцова, А.П. Полозкова, О.Л. Орлова, Н.А. Оборотова*

### **ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ЛХС-1208**

*ФГБНУ "РОНЦ им. Н.Н. Блохина", Москва*

**Актуальность.** Разработанная лекарственная форма ЛХС-1208 представляет собой лиофилизат для приготовления раствора для инъекций. Актуальным является изучение параметров качества раствора ЛХС-1208 после регидратации. Изменения показателей качества в процессе хранения раствора после регидратации указывает на нецелесообразность проведения биологических экспериментов.

**Задача исследования.** Изучение критериев качества лиофилизированной лекарственной формы после регидратации.

**Материалы и методы.** Субстанция ЛХС-1208, синтезированная в лаборатории химического синтеза НИИ ЭДиТО ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». Солюбилизатор Kollidon 17 PF (BASF, Германия), растворитель – диметилсульфоксид, чда (Химмед, Россия). Количественное определение содержания препарата проводили на спектрофотометре Cary 100 (Varian, Inc., Австралия) при длине волны 320 нм. Для измерения pH раствора использовали pH-метр HANNA pH 211 (Hanna Instruments, Германия).

**Результаты и выводы.** Проведенные исследования показали, что раствор ЛХС-1208 после регидратации лиофилизата ЛХС-1208 стабилен в течение всего периода исследований (3-е суток) по следующим показателям качества: внешний вид, значение pH и количественное содержание действующего вещества. Изменение количественного содержания ЛХС-1208 в процессе хранения полученного раствора укладывается в ошибку спектрофотометрического определения (~ 2 %). Незначительное снижение содержания ЛХС-1208 при регидратации лиофилизированной ЛФ после хранения: первые сутки – 0,3 %, вторые сутки – 0,3 %, третьи сутки – 0,4 %. Приведенные данные позволяют проводить доклинические исследования противоопухолевой активности разработанной лиофилизированной ЛФ ЛХС-1208 на животных с экспериментальными моделями опухолевого роста.

*Работа выполнена в рамках Государственного контракта 13411.1008799.13.120 от 24 июня 2013 г. «Доклинические исследования инновационного лекарственного средства на основе производного индокарбазола для лечения онкологических заболеваний».*

*О.И. Задорожная<sup>1</sup>, Л.Р. Тилова<sup>1</sup>, А.В. Савинкова<sup>1</sup>, К.И. Кирсанов<sup>1</sup>, А.М. Оглоблина<sup>1</sup>, М.Г. Якубовская<sup>1</sup>, И.В. Будинова<sup>2</sup>, Г.А. Белицкий<sup>1</sup>, Е.А. Лесовая<sup>1</sup>*

### **ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ СЕЛЕКТИВНОГО АГОНИСТА ГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО РЕЦЕПТОРА СРДА В КОМБИНАЦИИ С БОРТЕЗОМИБОМ *IN VIVO***

*<sup>1</sup>ФГБНУ "РОНЦ им. Н.Н. Блохина", Москва*

*<sup>2</sup>Northwestern University, Chicago, USA*

**Актуальность.** Аналоги глюкокортикоидов со сниженными побочными эффектами являются перспективной альтернативой в химиотерапии гемобластозов. Ранее было показано, что соединение этого класса, СpdA, обладает противоопухолевым эффектом *in vitro*. Однако эффекты СpdA в комбинации с химиотерапевтическими препаратами *in vivo* не изучались.

**Задачи исследования.** Оценка влияния СpdA в сочетании с ингибитором протеасом бортезомибом на рост подкожных ксенотрансплантатов лимфомы у бестимусных мышей и изучение молекулярных механизмов их совместного биологического действия.

**Материалы и методы.** Клетки лимфомы линии Granta подкожно вводились иммунодефицитным мышам. После перевивки животным внутрибрюшинно вводилось одно из изучаемых соединений. После извлечения опухолевой ткани проводился ее анализ с помощью ПЦР или иммуногистохимии.

**Результаты и выводы.** Впервые было показано синергическое противоопухолевое действие СpdA с ингибитором протеасом бортезомибом. В образцах от животных, получавших данную комбинацию, наблюдалось меньшее количество жизнеспособных клеток, чем в контроле. Также впервые было выявлено ингибирующее влияние СpdA на убиквитин-протеасомную систему в клетках гемобластозов *in vivo*.

УДК 616.351-006.6-08:615.454.1

*Н.Д. Олтаржевская<sup>1</sup>, М.А. Коровина<sup>1</sup>, Ю.А. Барсуков<sup>2</sup>, А.Г. Малихов<sup>2</sup>, Д.В. Кузмичев<sup>2</sup>, И.Ш. Татаев<sup>2</sup>***СОЗДАНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛЕЧЕБНЫХ ГЕЛЕЙ «КОЛЕГЕЛЬ»  
ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ  
ПРИ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЯМОЙ КИШКИ**<sup>1</sup>ООО «КОЛТЕКС», Москва<sup>2</sup>ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, Москва**Контактная информация***Барсуков Юрий Андреевич, д-р мед. наук, профессор, главный научный сотрудник отделения онкопроктологии НИИ КО***адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, тел. +7(903)5901148**e-mail:** [U\\_barsukov@mail.ru](mailto:U_barsukov@mail.ru)

Статья поступила 18.05.2015, принята к печати 10.08.2015.

**Резюме**

Вопросы транспорта и средств доставки лекарственных препаратов в организм непосредственно к органам, тканям, клеткам занимают все большее место в науке, в том числе и медицинской. Этот интерес обусловлен многими причинами и, прежде всего, огромной медицинской и экономической выгодой, получаемой от применения систем направленного транспорта лекарств, от возможности при использовании уже известных лекарств снизить побочные эффекты от их применения, значительно сократить терапевтические дозы препаратов. ООО «КОЛТЕКС» разработало и выпускает медицинские изделия для направленной доставки лекарств – гели «Колегель» с различными лекарственными препаратами, в том числе – для повышения эффективности лучевой терапии и для профилактики и лечения лучевых реакций. Эти гели широко используют в крупнейших онкологических учреждениях страны, они доказали свою высокую эффективность при лечении онкологических заболеваний. Их применение позволяет усилить результативность лучевого воздействия за счет введенных в гель модификаторов (сенситизаторов); защитить здоровые ткани, попадающие в зону облучения, от нежелательных повреждений; ускорить восстановление слизистых, предотвратить прерывание курсов облучения, приводящих к снижению эффективности лечения; сократить время госпитализации больных и повысить качество их жизни.

**Ключевые слова:** гели «Колегель», рак прямой кишки, комплексное лечение.*N.D. Oltarzhevskaya<sup>1</sup>, M.A. Korovina<sup>1</sup>, U.A. Barsukov<sup>2</sup>, A.G. Malikhov<sup>2</sup>, D.V. Kuzmichev<sup>2</sup>, I.Sh. Tataev<sup>2</sup>***DEVELOPMENT AND APPLICATION OF THERAPEUTIC GELS “KOLEGEL”  
FOR TARGETED DELIVERY OF DRUGS  
IN TREATMENT OF RECTAL CANCER**<sup>1</sup>LLC “KOLETEX”, Moscow<sup>2</sup>FSBI «N.N. Blokhin RCRC», Moscow**Abstract**

A large part of basic research including medical area studies transportation and delivery of drugs directly to the organs, tissues and cells. This interest has been caused by many reasons, and above all, by huge medical and economic benefits of directed transport, reduced side effects and significant reduction of therapeutic drug doses. LLC «KOLETEX» designs and manufactures therapeutic gels for targeted drug delivery – gels «Kolegel» with various drugs, with the aim to improve effectiveness of radiotherapy and prevent radiation reactions. These gels are widely used in major oncology clinics, they have proven to be highly effective in the treatment of cancer. Their application allows to enhance the effectiveness of radiation exposure due to the introduced modifiers (sensitizers), to protect healthy tissue in the irradiation zone, speed up recovery of mucous membranes, resulting in enhanced treatment efficacy, shorten hospital stay and improve patient's quality of life.

**Key words:** gels “Kolegel”, rectal cancer, radiotherapy, combined treatment.**Введение**

Вопросы направленной доставки лекарственных препаратов непосредственно к очагу поражения являются в настоящее время наряду с созданием самих лекарств объектом пристального ис-

следования врачей, биологов, фармацевтов, химиков. Направленная доставка способствует снижению токсичности при лечении онкологических больных, повышает экономичность лечения. В настоящее время сотрудниками ООО «КОЛТЕКС» совместно с клиницистами ведущих учреждений

страны (РОНЦ им. Н.Н. Блохина, «Онкологический институт им. П.А. Герцена» (МНИОИ), «РНЦРХТ» и др.) разработаны, апробированы и выпущены на отечественный рынок новые медицинские изделия для направленной доставки лекарств – гидрогели «Колегель». Однако для широкой аудитории многие вопросы, касающиеся технологии создания гелей «Колегель для направленной доставки лекарств к месту поражения, механизм их действия и показания к применению в схемах комбинированной терапии, в частности – в лечении больных раком прямой кишки, освещены недостаточно полно.

Основу гидрогелевой композиции «Колегель» составляют биополимер альгинат натрия, соль альгиновой кислоты, получаемой из водорослей, произрастающих в акватории северных морей (в частности, из бурых водорослей, растущих в Белом море). Благодаря строению полимерных цепей – основы солей альгиновой кислоты, композиция способна к гелеобразованию, а ее вязкость обусловлена молекулярной массой полимера и количеством поперечных сшивок («мостиков») между макромолекулами, возникающих под действием солей двухвалентных металлов (например, кальция).

В гелеобразующий полимер (кроме альгинатов натрия и кальция можно использовать соли хитозана, например – натриевую соль янтарной кислоты, сукцинат, натриевую соль гиалуроновой кислоты или композиции из этих полимеров) по определенной технологии вводят субстанцию лекарственного препарата (препаратов). Получаемую вязкую гидрогелевую композицию можно считать «депо» для лекарства, из которого по мере набухания полимера (все указанные полимеры-полисахариды относятся к неограниченно набухаемым) лекарство будет высвобождаться во внешнюю среду, причем за счет механической доставки (клизма, шприц) максимально близко располагаясь по отношению к пораженным тканям (опухоль, слизистая, и т.д.) и оказывая необходимое лечебное воздействие. Таким образом, гели «Колегель» в полной мере можно отнести к «депо-материалам».

Выбор полимеров для создания медицинских изделий «Колегель» связан не только со способностью указанных полисахаридов к гелеобразованию, с возможностью образовывать вязкие стабильные системы, с наличием разрешения Минздрава России на их использование в медицине, но и с их дополнительными лечебными свойствами. Например, у солей альгиновых кислот – это гемостатические свойства, большой набор в их составе микроэлементов, что способствует регенерации тканей: отмечена роль альгината как радиопротектора [6; 7]; сукцинат хитозана также улучшает восстановление тканей, обладает антиоксидантным и антибактериальным действием, при этом в литературе описано наличие у хитозана цитостатических свойств [11]. Что касается солей гиалуроновой кислоты, они обладают регенерирующим эффектом и усиливают действие введенных в них цитостатиков (например, фторурацила; [12]).

Вопрос о том, какие лекарственные препараты следует вводить в гидрогелевую композицию

при получении материалов «Колегель», конечно, в первую очередь решают клиницисты. Технологически в композиции можно использовать субстанции лекарств с различной растворимостью, в т.ч. – малорастворимые. Следует отметить, что полимер, основа композиции, дополнительно выполняет функцию защитного коллоида, что позволяет вводить не один, а несколько препаратов, предотвращая их взаимодействие между собой. Однако этот аспект в каждом конкретном случае требует изучения и оценки.

### Материалы и методы

Для повышения эффективности ЛТ в программе комплексного лечения больных РПК было предложено подводить известное электронацепторное соединение метронидазол внутриванально с помощью гидрогелевого материала «Колегель». Ранее проведенные исследования [8] показали, что для достижения эффекта радиосенсибилизации концентрация метронидазола в опухолевых тканях должна составлять не менее 150–200 мкг/г, что достижимо в случае перорального приема большими 40 таблеток препарата, но неминуемо приводит к высокой токсичности лечения.

Для достижения нужной концентрации при внутриванальном подведении лекарства и были разработаны гели «Колегель», содержащие 4,5 и 9,0% масс. лекарства (дополнительно гель содержал 2 % ДМСО). Больным с помощью шприца Жане вводили одинаковый объем «Колегеля». Вязкость композиции также была одинакова – 2,63 Па с (этот показатель максимально удобен для длительного удерживания геля в полости прямой кишки) [2]. После хирургического удаления опухоли определяли в ней концентрацию метронидазола спектрофотометрическим методом.

### Результаты и обсуждение

Изучение 165 образцов опухолевой ткани после ректального введения различной концентрации лекарства и разного времени экспозиции показало, что уже через 3 ч независимо от исходной концентрации метронидазола в полимерной композиции его содержание в опухоли достигало нужных значений (табл. 1). Однако оптимальной признана концентрация 9,0 % масс., т.к. в этом случае радиосенсибилизирующий уровень препаратов в опухоли сохраняется в течение 6–8 ч (рис. 1).

Как видно из данных табл. 1, содержание метронидазола 10 г/м<sup>2</sup> в полимерной композиции является наиболее оптимальным для длительного (6 ч) радиосенсибилизирующего нахождения его в опухоли.

Именно в такой концентрации «Колегель» с метронидазолом (регистрационное удостоверение № ФСР 2009/05407 «Салфетки атравматические гидрогелевые с метронидазолом, альгинатом натрия и димексидом «Колетекс-М», стерильные) разрешен для широкого клинического применения.

Таблица 1

Содержание метронидазола в тканях опухолей прямой кишки в зависимости от концентрации метронидазола в гидрогелевой композиции «Колегель»

Экспозиция, ч	Концентрация метронидазола, г/м <sup>2</sup> человека		
	6	8	10
3	219,0±17,1	226,4±21,7	225,3±27,6
4	82,9±20,5	136,5±24,8	178,0±45,1
5	80,5±19,7	127,0±28,5	191,6±31,5
6	-	101,5±19,3	229,1±29,7



Рис. 1. Динамика содержания метронидазола в опухоли (доза МЗ 10 г/м<sup>2</sup>).

На сегодняшний день лечебные материалы «Колегель» выпускают в тубах, пакетах-саше, шприцах различного объема, стерильные (после  $\gamma$ -стерилизации), рН 5,5-8,0 (рис. 2).

В отделении онкопроктологии НИИ КО РОНЦ с целью повышения эффективности ЛТ в программе комплексного лечения разработаны несколько новых методик для лечения операбельного, местнораспространенного РПК и плоскоклеточного рака анального канала с применением в схемах неoadъювантной ЛТ полимерной композиции «Колегель-М», содержащей метронидазол и локальной СВЧ-гипертермии (патенты РФ N 2477641; 2427399; 2234318; 2414936). Проведенный анализ разработанных схем комплексного лечения данной патологии показал, что разработанные программы комплексного лечения обладают приемлемым профилем токсичности, позволяют провести адекватное воздействие на первичную опухоль с соблюдением основных принципов онкохирургии – онкологической адекватности, максимальной безопасности и высокой функциональности.

Достоверное и существенное снижение частоты рецидивов и метастазов рака в условиях комплексного лечения позволило повысить 5-летнюю БРВ до 82,9 % по сравнению с таковой в группе хирургического лечения – 56,1 % и с результатами в группе комбинированного лечения – 65,6 % [4; 10].

Введение полимерной композиции «Колегель-М» в прямую кишку в схемах комплексного

лечения следует проводить с помощью мягких катетеров при нахождении пациента в положении лежа.

Одновременно с целью профилактики и лечения лучевых реакций нормальных тканей в процессе комплексного лечения созданы и активно применяются лечебные материалы на основе природного радиопротектора альгината с другими лекарственными препаратами – Колегель с иммуномодулятором деринатом, деринатом и анестетиком лидокаином, диоксидином и лидокаином, ДМСО [10].

Деринат относится к универсальным метаболическим модуляторам. Он обладает неспецифическим общебиологическим действием, нормализует иммунный статус, стабилизирует гемопоэз, усиливает регенерацию тканей. Его применение системно (в виде инъекций) в онкологической практике хорошо известно: он считается радиопротектором, понижающим негативное воздействие цитостатиков и облучения; добавление лидокаина снижает болевой синдром. Применение гелей «Колегель» возможно как в стационарных условиях, так и амбулаторно. Их использование начинается за 3–7 дней до ЛТ, продолжается во время лечения и в течение 3–6 недель после его окончания.

Экспериментальное изучение массопереноса лекарств из гидрогелевого материала «Колегель» в реальную внешнюю среду представляет большие сложности, связанные с малым и нестабильным объемом и неоднородностью данной среды (это приводит к неравномерностям в распределении лекарств).

Таблица 2

Влияние растворимости лекарственных препаратов на скорость их десорбции во внешнюю среду ( $H_2O$ ;  $t +23\text{ }^\circ\text{C}$ , используемый полимер – альгинат натрия 6%, начальная концентрация лекарственных препаратов постоянна)

Название	М.М.	Растворимость, %	$K_M 10^{-3} \text{C}^{-1}$
Фурацилин	198	0,0220	4,30
Фурадонин	238	0,0125	1,96
Фурагин	264	0,0077	1,13
Фуразолидон	225	0,0040	0,86



Рис. 2. Выпускные формы гелей «Колегель».

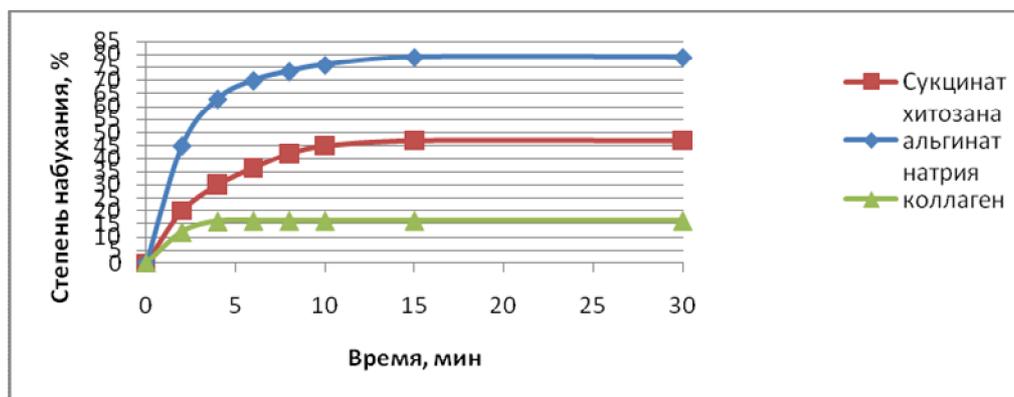


Рис. 3. Влияние природы полимеров на кинетику их набухания в воде.

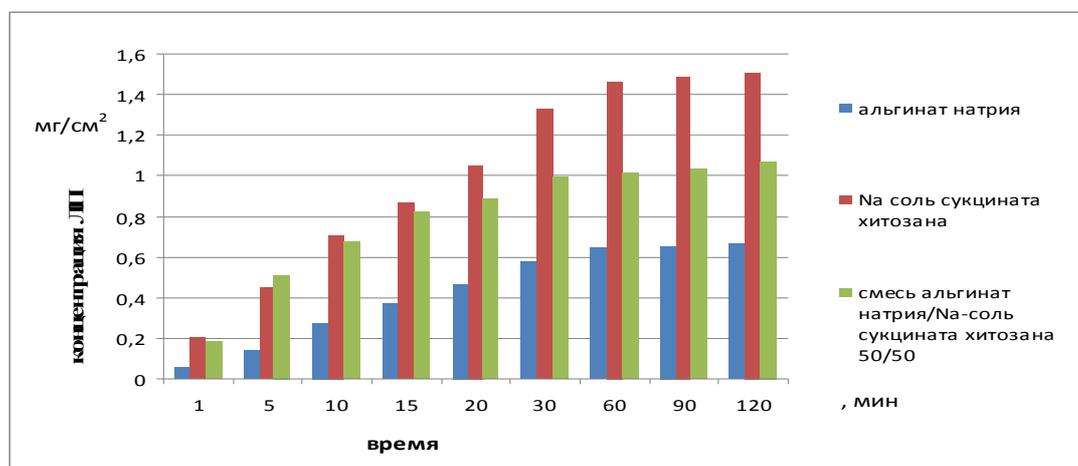


Рис. 4. Изменение концентрации лекарственного препарата 5-фторурацила при десорбции во внешнюю среду (многослойную мембрану из коллагеновых пленок) в зависимости от используемого полимера.

Мы изучали массоперенос в модельных условиях, начиная от моделирования внешней среды жидкими средами малого объема (дистиллированной водой, физиологическим раствором, бура-янтарным буфером), затем – раствором липовеноза как моделирующим жировую ткань, бычьей сывороткой альбумина, многослойными мембранами из коллагеновых пленок (как модель соединительной ткани), после чего следовали эксперименты на животных [9].

Полученные данные позволяют говорить о большом влиянии природы полимеров, их молекулярной массы и способности к набуханию на массоперенос введенных в них лекарств во внешнюю среду. Скорость массопереноса лекарств находится в прямой зависимости от скорости набухания полимеров (рис. 3). Используя различные полимеры, меняя их соотношение в композиции, можно влиять на массоперенос лекарства из геля в очаг поражения (рис. 4).

Большое влияние оказывают растворимость препарата и его сродство к биологическим тканям. Чем выше растворимость и меньше молекулярная масса лекарства, тем больше и быстрее скорость его массопереноса из полимерной композиции (десорбции) во внешнюю среду (табл. 2).

Важный вопрос – какова должна быть концентрация лекарства в геле, чтобы она обеспечивала его нужные для терапии (и разрешенные) значения в опухолевых или других близлежащих тканях.

Очевидно, что эффективность от направленного подведения лекарства (а это является основной целью действия терапевтических депоматериалов «Колегель») будет достигнута при максимальной, необходимой по медицинским показаниям концентрации лекарства в очаге поражения и минимальной – в крови и моче, особенно при использовании онкологических препаратов.

### Заключение

Улучшение результатов комплексного лечения при совместном применении полимерной композиции «Колегель-М», локальной СВЧ-гипертер-

мии и системной химиотерапии достигается за счет реализации важнейших радиобиологических эффектов – радиосенсибилизации, хемосенсибилизации и аддитивности радиосенсибилизирующих эффектов [2; 3; 5]. Созданные новые программы комплексного лечения больных РПК на основе использования этих радиобиологических эффектов защищены патентами РФ № 2477641; № 2427399; № 2234318; № 2414936.

Наряду с созданием последних вариантов комплексного лечения использование новых отечественных гидрогелевых лечебных материалов «Колегель» с такими препаратами как антиоксидант и иммуномодулятор деринат; антисептик диоксидин; анестетик лидокаин позволяет при их направленном подведении к очагу поражения онкологических больных решить важную лечебную и социально-значимую задачу – предотвратить или сократить лучевые реакции и осложнения, возникающие при лучевой и химиолучевой терапии онкологических заболеваний малого таза.

Надо также защитить здоровые ткани, попадающие в зону облучения, ускорить их восстановление, сократить, тем самыми, время госпитализации пациентов и повысить качество их жизни [10]. Простота применения гелей «Колегель», экономичность делают их незаменимым препаратом сопровождения при амбулаторном и стационарном лечении онкологических больных.

За разработку и внедрение способов лечения онкологических заболеваний при направленном подведении лекарственных препаратов, в т.ч. – при лечении РПК с использованием неоадьювантной ЛТ с применением нескольких локально подводимых радиомодификаторов (полимерной композиции с метронидазолом «Колегель-М» в сочетании с локальной СВЧ-гипертермией и системной цитотоксической терапией) группе авторов (Олтаржевская Н.Д., Барсуков Ю.А., Бойко А.В., Коровина М.А., Корьтова Л.И. и др.) присуждена премия Правительства Российской Федерации за 2013 г. в области науки и техники (N 230-р).

### Литература

1. Барсуков П.Ю., Ткачев С.И., Олтаржевская Н.Д. и др. Полирадиомодификация в комбинированном лечении рака прямой кишки: Рекомендации к лечению РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – М., 2009. – 46 с.
2. Барсуков Ю.А., Олтаржевская Н.Д., Ткачев С. И. и др. Способ лечения рака прямой кишки. Патент на изобретение 2477641.
3. Барсуков Ю.А., Ткачев С.И., Олтаржевская Н.Д. и др. Полирадиомодификация в комбинированном лечении рака прямой кишки; обоснование и результаты лечения // Вопросы онкологии. – 2010. – Т. 56, № 1. – С. 66–9.
4. Барсуков Ю.А., Ткачев С.И., Кныш В.И. и др. Комбинированное лечение рака прямой кишки с использованием полирадиомодификации // Вопр. онкологии. – 2008. – Т. 54, № 3. – С. 350–3.

5. Барсуков Ю.А. Комбинированное и комплексное лечение больных раком прямой кишки. – М., 2011. – 95 с.
6. Валуева М.И., Сокуренок В.П., Корытова Л.И. и др. Разработка и применение материалов сопровождения лучевого лечения на основе биополимера и препаратов-радиопротекторов // Материалы VIII Всероссийского национального конгресса лучевых диагностов и терапевтов «Радиология-2014». – 2014. – С. 395–6.
7. Валуева М.И., Федорова А.В., Фенин А.А., Олтаржевская Н.Д. Радиопротекторная активность металлокомплексов фенольных соединений в присутствии альгината натрия // Материалы докладов VIII Международного симпозиума». – 2012. – С. 35–6.
8. Дарьялова С.Л. Использование метронидазола в качестве радиосенсибилизатора при лучевом лечении больных со злокачественными новообразованиями и определение его концентрации в сыворотке крови и тканях: Метод. рекомендации. – М., 1989. – 13 с.
9. Коровина М.А. Разработка методологии и технологии создания лечебных текстильных и гидрогелевых аппликаций для направленной местной доставки лекарств при лучевой терапии онкологических заболеваний (теория и практика). – Дис. ... д-ра техн. наук, 2011. – 355 с.
10. Кузмичев Д.В. Применение радиосенсибилизатора метронидазола при лечении рака прямой кишки / В кн.: «Направленная доставка лекарственных препаратов при лечении онкологических больных» / Под ред. Бойко А.В., Корытовой Л.И., Олтаржевской Н.Д. – М.: МК, 2013. – С. 108–25.
11. Скрябин К.Г., Вихорева Г.А., Варламов В.П. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение. – М.: Наука, 2002. – 368 с.
12. Хабаров В.Н., Бойков П.Я., Селянин М.А. Гиалуроновая кислота: получение, свойства, применение в биологии и медицине. – М.: Практическая медицина, 2012. – 224 с.

УДК 612.118.221:616-006.04:546-022.53

*А.Н. Романов<sup>1</sup>, А.О. Ковригин<sup>1,2</sup>, А.Ф. Лазарев<sup>2</sup>, В.А. Лубенников<sup>2</sup>, Д.А. Романов<sup>1</sup>***ГИСТЕРЕЗИС ЗАВИСИМОСТЕЙ****ДИЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КРОВИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ**<sup>1</sup>*Институт водных и экологических проблем СО РАН, Барнаул*<sup>2</sup>*Алтайский филиал ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, Барнаул***Контактная информация***Романов Андрей Николаевич, д-р техн. наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории атмосферно-гидросферных процессов ИВЭП СО РАН***адрес:** 656038 Барнаул, ул. Молодежная, 1; **тел.** +7(3852)666462**e-mail:** [ran@iwep.ru](mailto:ran@iwep.ru)

Статья поступила 16.02.2015, принята к печати 10.06.2015.

**Резюме**

В работе представлены результаты исследований диэлектрических характеристик крови, 20 %-ного р-ра человеческого альбумина, 40 %-ного раствора глюкозы и 0,9 %-ного раствора NaCl, проведенных в температурном диапазоне 30–42 °С на частоте 0,6 ГГц. При температуре +37 °С для крови и альбумина выявлено скачкообразное возрастание показателя поглощения. Обнаружен гистерезис температурных зависимостей показателей поглощения крови и раствора альбумина в циклах нагревания–остывания. Добавление в р-р альбумина наночастиц углерода и оксида железа ведет к изменению температурных зависимостей по сравнению с р-ром альбумина, не содержащего наночастиц.

**Ключевые слова:** диэлектрические характеристики крови, альбумин, злокачественные новообразования, наночастицы углерода и оксида железа.

*A.N. Romanov<sup>1</sup>, A.O. Kovrigin<sup>1,2</sup>, A.F. Lazarev<sup>2</sup>, V.A. Lubennikov<sup>2</sup>, D.A. Romanov<sup>1</sup>***HYSTERESIS****OF BLOOD DIELECTRIC CHARACTERISTICS – TEMPERATURE RELATIONSHIP**<sup>1</sup>*Institute for Water and Environmental Problems SB RAS, Barnaul*<sup>2</sup>*FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Altai Branch, Barnaul***Abstract**

The paper presents the results of the study of dielectric blood characteristics – 20% solution of human albumin, 40% solution of glucose and 0,9% solution of NaCl, at the temperature ranging from 30 to 42 °C and the frequency of 0,6 GHz. At 37 °C the blood and albumin showed an abrupt increase in absorption. The hysteresis of temperature - absorption of blood and albumin in the heating-cooling cycles has been revealed. Addition of nanoparticles of iron oxide and carbon to albumin solution leads to the change of temperature dependence as compared to the nanoparticle-free albumin solution.

**Key words:** dielectric characteristics of blood, albumen, malignant neoplasms, nanoparticles of iron oxide and carbon.

**Введение**

В связи с анатомическими особенностями постоянство температуры человеческого тела является величиной условной. В медицине принято измерять её в подмышечной впадине, где нормой является величина 36,6 °С. Кроме того отмечаются циркадные колебания температуры с минимальными показателями в 3–4 ч ночи и максимальными в 4–6 ч дня. Основную роль в поддержании температуры тела играет кровь. Повышение температуры тела человека может быть обусловлено как физиологической реакцией на физическую, психическую нагрузку или изменение температуры, влажности внешней среды обитания, так и патофизиологической реакцией на возникшее заболевание.

В обоих вариантах повышение температуры тела является защитно-приспособительной реакцией, которая сопровождается изменением структуры белков плазмы крови вплоть до их денатурации. При повышении температуры возрастает скорость химических реакций и процессов как в организме в целом, так и непосредственно в крови. В результате этого обеспечивается возможность ликвидации очага воспаления.

Следует отметить, что при диагностике злокачественных новообразований субфебрильная температура зачастую может быть единственным признаком, который беспокоит больного. Данный симптом может предшествовать основным проявлениям онкологического заболевания за 4–6 мес до манифестации.

Такое проявление характерно для лимфом, миелолейкозов, лимфолейкозов.

Исследование влияния температуры на диэлектрические свойства крови и составляющих ее белковых компонентов является актуальным, т.к. позволяет разработать новые методы изучения процессов, происходящих с кровью при повышении температуры.

Диэлектрические свойства крови изучают более 50 лет. Исследовались диэлектрические свойства плазмы и сыворотки крови, биологических клеток, протеинов, ДНК, лизосом, различных фаз воды, присутствующей в клеточной мембране [11]. Измерены диэлектрические свойства эритроцитов и цитоплазмы в диапазоне частот 10 кГц÷250 МГц при температуре 10÷35 °С [17]. Установлено влияние температуры и гематокрита на диэлектрические свойства крови человека в частотном диапазоне 1 Гц÷40 ГГц [18]. Разработаны СВЧ-томографические методы определения глубинной температуры, основанные на увеличении интенсивности микроволнового излучения тела, характеризующейся более высокой температурой, что может быть вызвано образованием опухоли [3]. При температуре 25÷38 °С в радиодиапазоне обнаружены гистерезисные зависимости модуля диэлектрической проницаемости от температуры, присущие тканям живого организма [13]. Для изучения структуры и фазового состава крови используют дециметровый диапазон, в котором наиболее ярко проявляется влияние белков, аминокислот, растворенных веществ, а также наблюдаются заметные различия в диэлектрических свойствах свободной и связанной воды [5].

Исследовано влияние температуры и концентрации клеток крови на комплексную диэлектрическую проницаемость крови человека в диапазоне частот 30 Гц-30 МГц. Показано, что диэлектрические параметры крови зависят от степени агрегации клеток. Зависимость статической диэлектрической проницаемости крови от температуры имеет максимум при +37 °С [16]. Установлено, что диэлектрические свойства крови здорового человека и крови диабетиков с разным содержанием глюкозы различаются. Влияние глюкозы на диэлектрические свойства крови проявляется в изменении времени диэлектрической релаксации. Это может быть использовано в качестве диагностического признака диабета [14].

Для описания диэлектрических свойств крови, эритроцитов, биологических жидкостей используются модели Максвелла-Вагнера-Ханаи, Лоэнга [15]. В белковых структурах присутствуют водные фракции, различающиеся по диэлектрическим свойствам: прочно связанная вода, первый и второй гидратные слои воды, имеющие разное время релаксации, объемная вода [4]. С ростом температуры уменьшается количество связанной воды, изменяется способность белка сорбировать воду. В результате этого затрудняется перестройка структуры в процессе сорбции воды и возникает гистерезис [12].

При исследовании диэлектрических параметров концентрированных водных р-ров белков и

лизосом в диапазоне частот 1 МГц÷40 ГГц при температурах 275÷330 °К обнаружено 3 области дисперсии. Они могут быть связаны с вращением полярных молекул белка в их водной среде, реориентационным движением свободных молекул воды и движением молекул связанной воды в гидратных оболочках [19].

Исследование диэлектрических свойств биологических жидкостей человека (кровь, слюна, пот, моча) и находящихся в них металлических наночастиц показало, что диэлектрические свойства биологических жидкостей различаются.

При этом различие зависит как от видов биологической жидкости, так и от типа и концентрации наночастиц [7; 8]. Результаты проведенных исследований указывают на возможность разработки радиофизических методов обнаружения наночастиц в организме человека.

В настоящей работе исследовали в температурном диапазоне 30÷42 °С на частоте 0,6 ГГц диэлектрические характеристики крови, р-ра альбумина человека, р-ра глюкозы и р-ра NaCl.

#### Материалы и методы

Основными характеристиками, описывающими диэлектрические свойства материальных сред, являются комплексная диэлектрическая проницаемость (КДП), которая может быть выражена через действительную ( $\epsilon'$ ) и мнимую ( $\epsilon''$ ) части [3]:

$$\epsilon = \epsilon' + i \cdot \epsilon''$$

и комплексный показатель преломления (КПП), связанный с КДП следующим выражением:

$$N = \sqrt{\epsilon} = n + i \cdot \kappa, \text{ где}$$

$n, \kappa$  – показатели преломления и поглощения.

Используя эти формулы можно установить связь между действительными и мнимыми частями КДП и КПП:

$$\begin{cases} \epsilon' = n^2 - \kappa^2, \\ \epsilon'' = 2n\kappa. \end{cases}$$

Приведенные параметры являются основными диэлектрическими характеристиками биологических жидкостей.

Диэлектрические характеристики биологических жидкостей исследовали на лабораторной установке, изготовленной с использованием прибора ФК2-18 («Измеритель разности фаз») и позволяющей определять диэлектрические параметры жидкостей в диапазоне частот 0,3÷12 ГГц. Технические характеристики: диапазон однозначных измерений фазы  $180 \pm 1$  град.; диапазон измерения

затуханий –  $0 \pm 60 \pm 0,5$  дБ. Блок-схема установки изображена на рис. 1. В состав входят следующие элементы: Г – генератор сигналов высокочастотный Г4-76А; ДМ – делитель мощности согласованный; ЛПД – линия переменной длины; А1, А2, А3 – аттенюаторы согласующие коаксиальные; И – измерительный блок фазометра; К – измерительный контейнер для образца, выполненный в виде отрезка коаксиальной линии. Это в подпись к рисунку

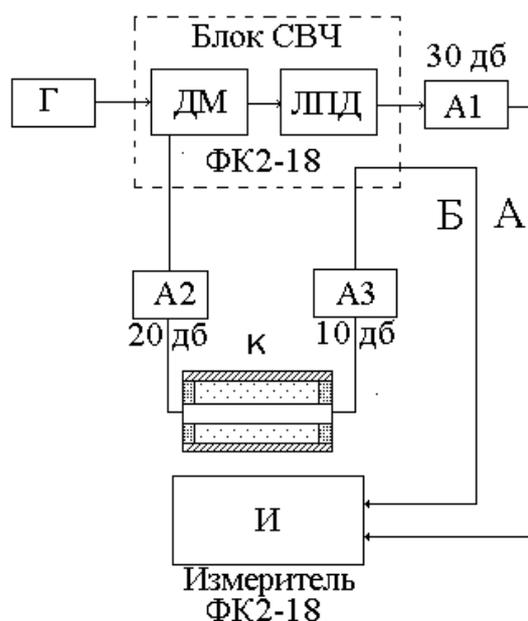


Рис. 1. Схема установки мостового типа на основе измерителя фаз.

Процесс измерений: с помощью ДМ производили балансировку мостовой схемы, в плечо которой устанавливали пустой измерительный контейнер, сигнал от генератора подавали на ДМ и делили поровну между опорным (А) и измерительным (Б) каналами. В начале измерений, при отсутствии в контейнере исследуемого образца, устанавливали нулевое значение разности фаз и амплитуд на ФК2-18, затем в контейнер помещали образец и по индикатору отсчитывали значения разности фаз и затухание.

Для эксперимента использовали образцы цитратной крови, 20 %-ного р-ра альбумина, 40 %-ного р-ра глюкозы, 0,9 %-ного р-ра NaCl. Измерения проводились в температурном интервале  $28 \div 42$  °С на частоте 0,6 ГГц. Для оценки влияния наночастиц на температурные зависимости диэлектрических свойств альбумина использовались наночастицы оксида железа ( $Fe_3O_4$ ) и углерода (нанодIAMAZы). Магнитный наноразмерный порошок  $Fe_3O_4$  был получен методом механохимического синтеза из солевых систем (материал изготовлен в Отделе структурной макрокинетики Томского научного центра СО РАН [2; 6; 9]). Исследованные образцы представляли собой наноразмерные сферические частицы  $\varnothing$  3–15 нм, объединенные в сла-

босвязанные агрегаты. Доля наночастиц, меньших 10 нм, составляла 65 %, площадь удельной поверхности  $\sim 150$  м<sup>2</sup>/г [2].

Для исследования углеродных наночастиц использовалась алмазная шихта детонационного синтеза, изготовленная в ФГУП ФНПЦ «Алтай» [6; 10] (промышленная марка УДА, средний размер наночастиц – 3–5 нм, площадь удельной поверхности  $\sim 400$  м<sup>2</sup>/г).

В р-р альбумина объемом 3–4 мл добавлялись наночастицы до их выпадения в осадок. Затем раствор тщательно перемешивали и отстаивали течение суток при температуре +5 °С. Для эксперимента отбирали требуемое количество образца с оставшейся в нем взвесью наночастиц. Наночастицы, выпавшие в осадок, удалялись из р-ра и в дальнейшем не использовались. Для измерений отбирались образцы объемом 1–2 мл. Массовая доля жидкой компоненты составляла  $81 \pm 1\%$ , массовая доля сухого остатка –  $19 \pm 0,5\%$ . Массовая доля наночастиц в альбумине не превышала 0,3 %. Плотности исследованных образцов составляли для чистого альбумина и альбумина с добавками оксида железа и нанодIAMAZов 1,16 г/см<sup>3</sup>; 1,21 г/см<sup>3</sup> и 1,13 г/см<sup>3</sup> соответственно. Незначительное отличие плотностей чистого альбумина и альбумина, содержащего тяжелые металлические и легкие углеродные наночастицы, объясняется тем, что часть белкового раствора заменяли тяжелыми или легкими (по сравнению с чистым альбумином) наночастицами.

Для оценки случайной погрешности проводились 20-кратные измерения диэлектрических параметров крови и альбумина. Суммарная погрешность определялась как сумма случайной погрешности, рассчитанной по известным методикам (см., например [1]), и стандартной погрешности, указанной в паспорте прибора.

## Результаты и обсуждение

На рис. 2 приведены измеренные при разных температурах (t) значения показателей поглощения (κ) крови с суммарными погрешностями. На этом же рисунке приведены построенные методом наименьших квадратов (с использованием программы Origin.6.1) эмпирические зависимости κ(t) крови на частоте 0,6 ГГц при нагревании (1/1, 1/2, 1/3) и последующем остывании (2). Видно, что зависимости κ(t) заметно различаются, образуя гистерезис. В цикле «нагревание» поведение величин κ в разных температурных интервалах различно. Зависимость κ(t) была аппроксимирована тремя прямыми линиями (1/1, 1/2, 1/3), имеющими вид:

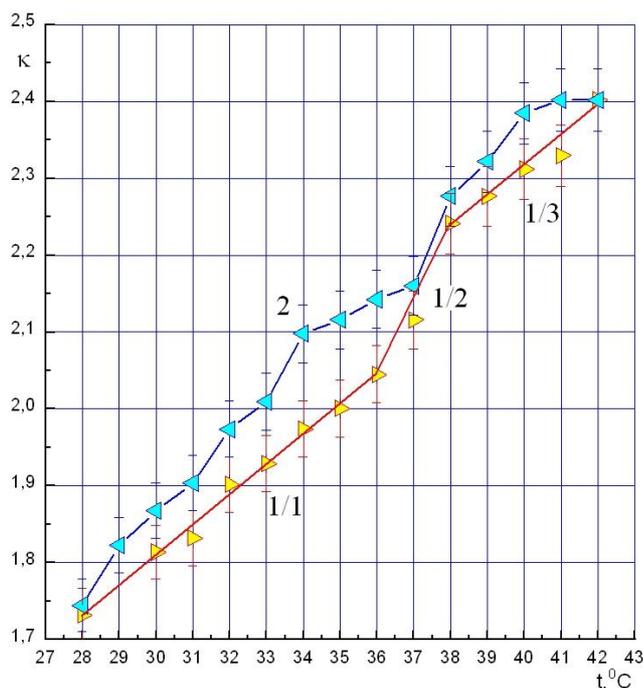
$$1/1: t = 28 \dots 36^\circ\text{C}: \kappa = (0,9 \pm 0,045) + (0,039 \pm 0,0014)t, \sigma = 0,0098, \quad (1)$$

$$1/2: t = 36 \dots 38^\circ\text{C}: \kappa = -(1,5 \pm 0,58) + (0,10 \pm 0,0016)t, \sigma = 0,022, \quad (2)$$

$$1/3: t = 38 \dots 42^\circ\text{C}: \kappa = (0,7 \pm 0,3) + (0,039 \pm 0,008)t, \sigma = 0,017, \quad (3)$$

где  $\sigma$  – среднеквадратическая погрешность.

Как видно из рис. 2, после прекращения нагревания и начала остывания значения κ не изменяются при понижении температуры на два градуса. Видимо, это связано с инерционностью системы, не успевающей вернуться в исходное состояние.



**Рис. 2.** Зависимости  $\kappa$  крови на частоте 0,6 ГГц от температуры в циклах нагревание (1) и остывания (2): линии 1/1 – 1/3 построены по формулам (1) – (3).

В результате этого возникает гистерезис. При дальнейшем понижении температуры также наблюдается различие в значениях  $\kappa$  при одинаковой температуре в циклах «нагревание/остывание». Это может быть связано с различиями пространственных структур белковых элементов.

Таким образом, можно говорить о двух петлях гистерезиса, возникающих в результате разных физических механизмов.

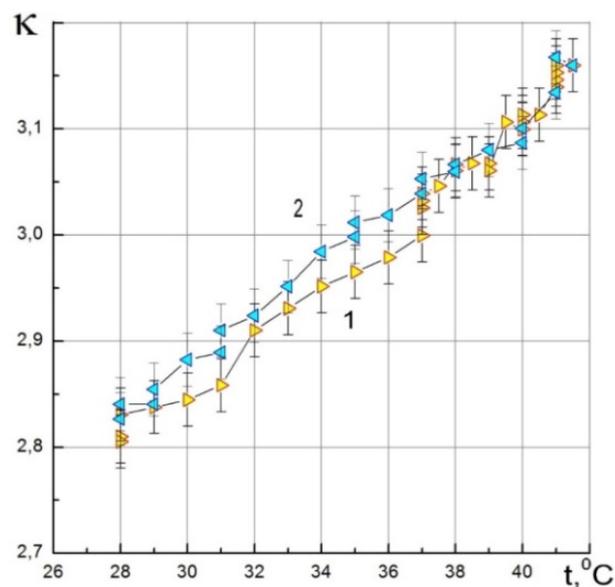
Появление гистерезиса может быть связано с изменением структуры крови и составляющих ее белков. На зависимостях  $n(t)$  и  $\kappa(t)$  р-ров NaCl и глюкозы гистерезис не образуется. Зависимости, построенные методом наименьших квадратов, имеют вид:

$$n = (A_0 \pm \Delta A_0) + (A_1 \pm \Delta A_1), \quad (4)$$

$$\kappa = (B_0 \pm \Delta B_0) + (B_1 \pm \Delta B_1), \quad (5)$$

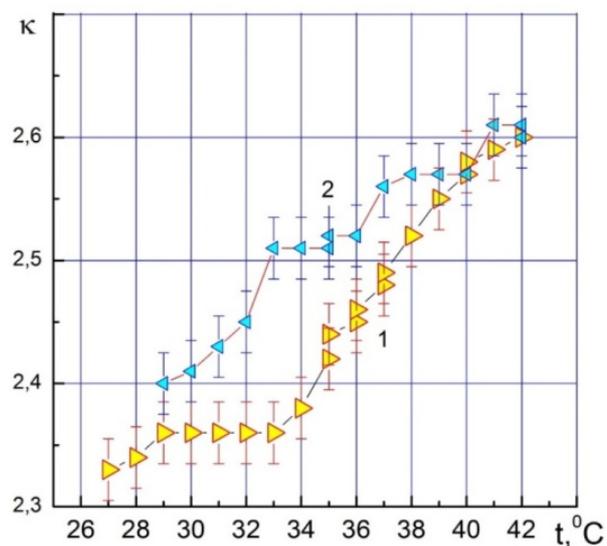
где  $A_0$ ,  $\Delta A_0$ ,  $A_1$ ,  $\Delta A_1$ ,  $B_0$ ,  $\Delta B_0$ ,  $B_1$ ,  $\Delta B_1$  – численные коэффициенты и их погрешности, значения которых приведены в табл.

На рис. 3 приведена зависимость  $\kappa(t)$  р-ра альбумина от температуры, измеренная на частоте 0,6 ГГц. Видно, что зависимости  $\kappa(t)$  в циклах нагревания-остывания образуют гистерезис. В цикле нагревания виден скачок  $\kappa$  при температуре 37 °С, который может быть связан с изменениями, происходящими в структуре молекул альбумина при данной температуре. Соответственно, гистерезис, возникающий при нагревании-остывании может быть обусловлен тем, что нагретый до 42 °С альбумин при охлаждении образует другую структуру, отличную от той, которую он имел до нагревания.



**Рис. 3.** Зависимости  $\kappa$  р-ра альбумина от температуры на частоте 0,6 ГГц

Известно что структура альбумина зависит не только от температуры, но и от различных веществ с которыми взаимодействуют его молекулы. При этом в разных температурных интервалах влияние одних и тех же веществ может быть различным. Для оценки этих изменений исследовалось влияние температуры на диэлектрические характеристики р-ра альбумина, содержащего углеродные и металлические наночастицы. Как видно из рис. 4, добавка наноалмазов существенным образом меняет зависимость  $\kappa(t)$ . На ней прослеживается скачок  $\kappa$  в диапазоне 33–42 °С. Возможно, присутствие наноалмазов, представляющих собой наночастицы, размером 1–10 нм с большой удельной поверхностью способствует изменению фазового состава воды в р-ре альбумина.



**Рис. 4.** Зависимости краствора альбумина с добавлением наноалмазов от температуры на частоте 0,6 ГГц.

Таблица

Численные коэффициенты и их погрешности в формулах (4)-(5)

Вещество	Цикл	$A_0 \pm \Delta A_0$	$A_1 \pm \Delta A_1$	$\sigma_n^*$	$B_0 \pm \Delta B_0$	$B_1 \pm \Delta B_1$	$\sigma_k^*$
0,9% p-p NaCl	Нагревание	$9,7 \pm 0,1$	$-(0,006 \pm 0,003)$	0,033	$1,68 \pm 0,05$	$0,049 \pm 0,001$	0,017
	Остывание	$9,62 \pm 0,07$	$-(0,003 \pm 0,002)$	0,027	$0,4 \pm 0,11$	$0,078 \pm 0,003$	0,04
40% p-p глюкозы	Нагревание	$7,77 \pm 0,03$	$-(0,009 \pm 0,001)$	0,012	$0,63 \pm 0,01$	$-(0,004 \pm 0,0003)$	0,005
	Остывание	$7,54 \pm 0,03$	$-(0,0047 \pm 0,0001)$	0,012	$0,55 \pm 0,018$	$-(0,0025 \pm 0,0001)$	0,019

\* $\sigma_n$ ,  $\sigma_k$  – среднеквадратические отклонения n и k

Также обращает на себя внимание нелинейная зависимость  $\kappa(t)$  (рис. 5) в цикле остывания. Видно, что скачкообразное уменьшение значений  $\kappa$  чередуется с плавными изменениями при уменьшении температуры. Причины подобных изменений могут быть связаны с изменениями структуры, происходящими в разных температурных интервалах.

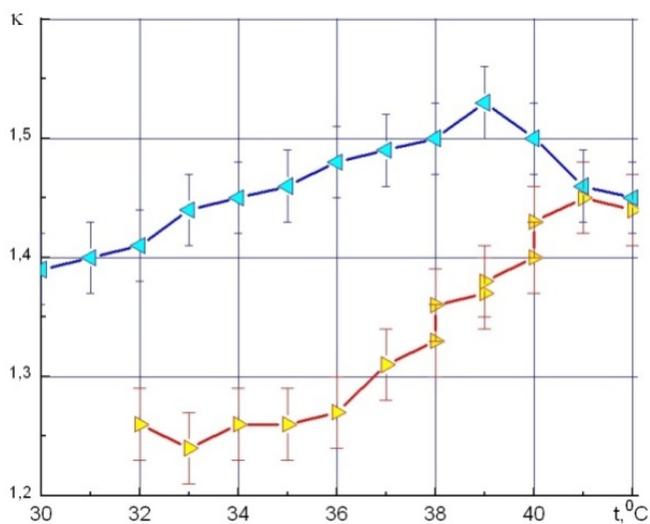


Рис. 5. Зависимости  $\kappa$  раствора альбумина с добавлением  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  от температуры на частоте 0,6 ГГц.

На рис. 4 приведена зависимость  $\kappa(t)$  p-р альбумина с добавкой наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , измеренная на частоте 0,6 ГГц. Добавка  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  как и наноалмазов существенным образом изменяет зависимость  $\kappa(t)$ . На ней прослеживается резкое возрастание  $\kappa(t)$  в диапазоне 36–40 °C. При этом наблюдаются отдельные скачки  $\kappa$  при температурах 38 и 40 °C. Причиной этих скачков может быть изменение структуры альбумина при взаимодействии с металлическими наночастицами, хорошо проводящими тепло.

При остывании наблюдается возрастание величины  $\kappa$ . Причиной этого может быть образование в альбумине компоненты с более

#### Литература

1. Зажигаев Л.С., Кишьян А.А., Романиков Ю.И. Методы планирования и обработки результатов физического эксперимента. – М., Атомиздат, 1978. – 232 с.
2. Найден Е.П., Журавлев В.А., Итин В.И. и др. Магнитные свойства и параметры структуры наноразмерных порошков оксидных ферритмагнетиков, полученных методом механохимического синтеза из солевых систем // Физика твердого тела. – 2008. – Т. 50, вып. 5. – С. 857–63.

высокими значениями  $\kappa$ , либо изменение фазового состава воды в результате нагрева до температуры, близкой к температуре денатурации белка и появления свободной воды, возможно, выделившейся при денатурации белка.

Из графиков зависимостей  $\kappa(t)$  на рис. 4 видно, что наблюдаемые отличия значительны, и система не возвращается в первоначальное состояние. Одной из причин такого поведения может быть локальный перегрев белковых структур при контакте с металлическими наночастицами, ведущий к денатурации белка. В результате связанная с белком вода становится свободной. Данный вопрос является важным, так как в последние годы одной из актуальных тем является использование магнитных частиц для доставки лекарств к злокачественным опухолям и уничтожения их путем воздействия магнитным полем на металлические наночастицы [6].

#### Заключение

В результате проведенных исследований получены следующие основные результаты:

1. Обнаружена петля гистерезиса на зависимостях показателей поглощения крови от температуры в циклах нагревания–остывания.
2. Обнаружен скачок показателя поглощения  $\kappa$  при температуре +37 °C для крови и альбумина. Сделан вывод, что реакция воспаления отражается на белковой фракции.
3. Добавление в p-р альбумина наночастиц углерода и оксида железа способствует существенному изменению вида зависимости  $\kappa(t)$  по сравнению с p-ром альбумина, не содержащего наночастиц. При этом интервал скачкообразных изменений величины  $\kappa$  для растворов с добавками наночастиц оказывается различным.

Полученные результаты могут быть использованы при дальнейших исследованиях влияния температуры на диэлектрические свойства крови, белков и других биологических жидкостей.

3. Поляков В.М., Шмаленюк А.С. СВЧ-термография и перспективы ее развития. Применение в медицине и народном хозяйстве / Обзоры по электронной технике. Серия 1. Электроника СВЧ. Вып. 8 (1640). – М.: Изд-во ЦНИИ Электроника, 1991. – 58 с.
4. Применение КВЧ-излучения низкой интенсивности в биологии и медицине (сб. тезисов докладов VII Всесоюзного семинара). – М.: ИРЭ АН СССР, 1989.
5. Романов А.Н., Винокурова Е.Ю., Ковригин А.О. и др. Диэлектрические характеристики биологических жидкостей человека при развитии онкологических заболеваний. – Барнаул, 2008. – 72 с.
6. Романов А.Н., Романова Н.А., Яворовский Н.А. и др. Сравнительный анализ диэлектрических свойств наноразмерных порошков алюминия, железа и углерода в микроволновом диапазоне // Известия вузов. Физика. – 2012. – Т. 55, № 6/2. – С. 225–31.
7. Романов А.Н., Романов Д.А. Диэлектрические свойства биологических жидкостей человека, содержащих наночастицы // Сборник трудов VI Троицкой конференции «Медицинская физика и инновации в медицине». – 2014. – С. 261–3.
8. Романов Д.А. Оценка влияния наночастиц на диэлектрические свойства биологических жидкостей человека // Естественнонаучные основы теории и методов защиты окружающей среды: тезисы докладов III Всероссийской молодежной научной конференции, 23–24 апреля 2014 г. – СПб.: СПбГУКиТ, 2014. – С. 30–1.
9. Романова Н.А., Магаева А.А., Романов А.Н. и др. Диэлектрические свойства наноразмерного порошка  $Fe_3O_4$  в микроволновом диапазоне (тезисы) // Труды научно-технической конференции с международным участием «Ультрадисперсные порошки, наноструктуры, материалы: получение, свойства, применение». V Ставеровские чтения. Красноярск. – 2009. – С. 104–5.
10. Романова Н.А., Романов А.Н., Ларионова И.С., Ладыгин Ю.И. Диэлектрические свойства водных растворов ультрадисперсных алмазов в микроволновом диапазоне // Труды научно-технической конференции с международным участием «Ультрадисперсные порошки, наноструктуры, материалы: получение, свойства, применение». V Ставеровские чтения. Красноярск. – 2009. – С. 24–6.
11. Седунов Б.И., Франк-Каменецкий Д.А. Диэлектрическая проницаемость биологических объектов // Успехи физических наук. – 1963. – LXXIX, Вып. 4. – С. 617–39.
12. Файзуллин Д.А., Сироткин В.А., Соломонов Б.Н., Федотов В.Д. Межмолекулярные взаимодействия и вторичная структура сывороточного альбумина человека в системе белок-вода-ацетонитрил по данным ИК-спектроскопии // Химия и компьютерное моделирование. Бутлеровские сообщения. – 1999. – № 2. [Электронный ресурс] – Режим доступа: [http://chem.kstu.ru/butlerov\\_comm/vol1/cd-a1/data/JCHEM&CS/RUSSIAN/n2/appl2/c-mcs44/c-mcs44.htm](http://chem.kstu.ru/butlerov_comm/vol1/cd-a1/data/JCHEM&CS/RUSSIAN/n2/appl2/c-mcs44/c-mcs44.htm). (дата обращения 12.01.2015).
13. Шестинеров В.А., Колмаков Д.Н. О нелинейности температурной зависимости диэлектрической проницаемости живых тканей на сверхвысоких частотах // Биофизика. – 1990. – Т. 35, Вып. 5. – С. 846–9.
14. Abdalla S. Gaussian distribution of relaxation through human blood // Physica B: Condensed Matter. – 2011. – 406(3). – P. 584–7.
15. Bordi F., Cametti C., Gili T. Dielectric spectroscopy of erythrocyte cell suspensions. A comparison between Looyenga and Maxwell–Wagner–Hanai effective medium theory formulations // Journal of Non-Crystalline Solids. – 2002. – 305(1–3). – P. 278–84.
16. Chelidze T. Dielectric spectroscopy of blood // Journal of Non-Crystalline Solids. – 2002. – 305(1–3). – P. 285–94.
17. Sudsiri J., Wachner D., Gimsa J. On the temperature dependence of the dielectric membrane properties of human red blood cells // Bioelectrochemistry. – 2007. – 70(1). – P. 134–40.
18. Wolf M., Gulich R., Lunkenheimer P., Loidl A. Broadband dielectric spectroscopy on human blood // Biochimica et Biophysica Acta (BBA). – 2011. – 1810(8). – P. 727–40.
19. Wolf M., Gulich R., Lunkenheimer P., Loidl A. Relaxation dynamics of a protein solution investigated by dielectric spectroscopy // Biochimica et Biophysica Acta (BBA). – 2012. – 1824(5). – P. 723–30.

Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты»

*Н.В. Позднякова, А.В. Смирнова, О.О. Рябая*

#### **МИЦЕЛЛЯРНЫЕ ФОРМЫ РЕНТГЕНОКОНТРАСТНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

*ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия*

**Актуальность.** Использование рентгеноконтрастных веществ для диагностических и терапевтических целей нашло широкое применение в практике. В настоящее время ведется разработка новых препаратов, обладающих улучшенными свойствами.

**Цель и задачи.** Получение мицеллярных форм рентгеноконтрастных препаратов со сниженной общей токсичностью и увеличенным временем циркуляции в крови с использованием ретиноевой кислоты.

**Материалы и методы.** Конденсация ретиноевой кислоты с комплексообразователем (ДТПА) осуществлялась в два этапа. Сначала получали аминоксодержащее производное ретиноевой кислоты, затем проводили реакцию с диангидридом ДТПА. Для контроля этапов синтеза использовался адаптированный метод определения аминоксодержания. Состав конъюгата определяли спектрофотометрически с помощью тестового связывания с ионами меди. Мицеллы получали стандартным методом вытеснения органического растворителя из двухфазной системы с последующим диализом против фосфатно-солевого буфера. Размер наночастиц определяли методом динамического светорассеяния.

**Результаты и выводы.** Получен мицеллярный препарат, содержащий мицеллообразующее вещество полоксамер F-127 и рентгеноструктурный компонент – конъюгат ретиноевой кислоты с хелатором ДТПА в комплексе с гадолинием. Эффективность включения конъюгата в мицеллы составляла от 40 до 87 %. Препарат обладал узким диапазоном распределения наночастиц по размеру со средним диаметром 118 нм. Стабилен при хранении в течение как минимум 2 недель.

*Д.С. Хачатрян<sup>1</sup>, А.В. Колотаев<sup>1</sup>, А.Н. Балаев<sup>2</sup>, В.Н. Осипов<sup>2</sup>, К.А. Охманович<sup>2</sup>*

#### **ДИЗАЙН И СИНТЕЗ НОВЫХ ЛИНЕЙНЫХ ПЕПТИДНЫХ АНАЛОГОВ СОМАТОСТАТИНА**

<sup>1</sup>ФГУП «ИРЕА», Москва

<sup>2</sup>ЗАО «Фарм-Синтез», Москва

**Задачи исследования.** Выбор вариантов и разработка оптимальных методов синтеза пептидных аналогов гипоталамического гормона соматостатина.

**Материалы и методы.** Аналоги соматостатина в настоящее время широко применяются в диагностике и лечении различных заболеваний, особенно эндокринных расстройств и рака, в том числе препараты Октреотид и Ланреотид, широко используемые в медицинской практике. Исследования в области синтеза новых пептидных аналогов соматостатина постоянно расширяются. Одним из перспективных направлений является поиск активных соединений в области коротких линейных пептидов с различными функциональными заместителями. Наша работа направлена на синтез модифицированных линейных пентапептидов, являющихся фрагментами природного соматостатина.

**Результаты.** На основании анализа литературных данных проведён выбор вариантов модифицированных пентапептидов и стратегий их синтеза. Разработаны новые оптимизированные методы получения защищённых аминокислот, используемых для синтеза целевых пентапептидов. Разработанные методы позволяют получать защищённые аминокислоты с хорошими выходами и высокими показателями качества, при наименьшей затрате средств, с низкой себестоимостью производства. Исследованы возможности получения защищённых аминокислот одnoreакторным методом, включающим в себя две стадии синтеза. Исследовано влияние на выход и чистоту конечных соединений таких условий как использование различных реагентов, их соотношения и параметров проведения процесса.

**Выводы.** В результате проведённых исследований разработаны новые одnoreакторные методы синтеза двух защищённых аминокислот:  $\epsilon$ -N-трет-бутилоксикарбонил-L-лизина и N-трет-бутилоксикарбонил-1,3-L-тиазолидин-4-карбоновой кислоты и оптимизированы условия синтеза пяти защищённых аминокислот, используемых для синтеза пептидных аналогов соматостатина.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках Соглашения № 14.576.21.0044 от 05.08.14.*

## СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АОС – антиоксидантная система	МАРК – митоген-активируемые протеинкиназы
АОК – антителообразующие клетки	МЛВ – мультиламеллярные везикулы
АЛК – 5-аминолевулиновая кислота ( $\delta$ -aminolevulinic acid)	МДС – миелодиспластический синдром
АФК – активные формы кислорода	МВДП – медиана времени до прогрессирования
АЛС – антилимфоцитарная сыворотка	МИБТ – медицинские иммунобиологические препараты
АТГ – антитимоцитарный глобулин	МЛ – моноклеарные лейкоциты
АТК – аденокарцинома толстой кишки	ММ – метамиелоцит(ы)
БОВ – Большие одноламеллярные везикулы	ММР – матриксные металлопротеиназы
БПВП – базисные противовоспалительные препараты	МКА – моноклональные антитела
БКС – бинарная каталитическая система	ММ – множественная миелома
ВБН – вирус болезни Ньюкасла	МОВ – медиана общей выживаемости
ВКМ – внеклеточный матрикс	МРЛ – мелкоклеточный рак легкого
ВРПС – водорастворимые полисахариды	ММП – матриксные металлопротеиназы
ВМ – васкулогенная мимикрия	МРТ – магнитно-резонансная томография
ВЧД – внутричерепное давление	МЧРА – метилчувствительный рестриктивный анализ
ВЭБ – вирус Эпштейна-Барр	НАД – никотинамидадениндинуклеотид
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография	НК – натуральные киллеры
ВЭФР-А – васкулоэндотелиальный фактор роста-А	НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого
в/б – внутривенно	НО – нанооболочки
в/в – внутривенно	НПТ – наилучшая поддерживающая терапия
ГДА – гистоновая деацетилаза	НСф – наносферы
ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа	НСт – наностержни
ГИСО – гастроинтестинальные стромальные опухоли	НСПВС – нестероидные противовоспалительные средства
ГИБП – генно-инженерные биологические препараты	НХЛ – неходжкинская лимфома
ГК – гепатоцеллюлярная карцинома	НЭ – нуклеиновый эквивалент
бГК – быстрорастущая дедифференцированная	ОбО – объективный ответ
гепатоцеллюлярная карцинома	ОДС – оптическая диффузионная спектроскопия
мГК – медленно растущая гепатоцеллюлярная	ОО – отсутствие ответа
карцинома	ОКТ – оптическая когерентная томография
ГПВ/GPV – гликопептидная противоопухолевая вакцина	ОЦ – окисленные целлюлозы
(glycopeptide cancer vaccine)	ОЦК – объем циркулирующей крови
ГЯФ – гепатоцитарные ядерные факторы	ОП – опухолевой плеврит
ДГПЖ – доброкачественная гиперплазия	ОМ – опухолеассоциированные маркеры
предстательной железы	ОЭ – объективный эффект
Докс – Доксорубин	ПАВ – поверхностно активные вещества
ИК Докс – иммунолипосомальные конструкции с	НПАВ – неионогенные поверхностно-активные вещества
доксорубином	ПВП – поливинилпирролидон
ДРС – динамическое рассеяние света	ПД – пролиферация и дифференцировка
ДМБА – диметил- $\alpha$ -бензантрацен	ПЖ – поджелудочная железа
ДМТ – ДНК-метилтрансферазы	ПЗ – прогрессирование заболевания
ДЛФО – теория Дерягина – Ландау – Фервея – Овербека	ПМЗО – первично-множественные злокачественные ново-
ДК – диеновые конъюгаты	образования
ДЭС – двойной электрический слой	ПО – полный ответ
ЖТ – жировая ткань	ПОПР – полиоксипропилен
ЗНО – злокачественные новообразования	ПС – плевросклерозирующие средства
ЗО – злокачественное образование	ПСА – простатический специфический антиген
ЗХВК – золотохлористоводородная кислота	ПСАсв – простатический специфический антиген,
ИДМ – иммунодефицитные мыши	свободная форма
ИДР – инфильтративный дольковый рак (МЖ)	ПСАобщ – простатический специфический
ИК – иммунолипосомальные конструкции	антиген, общая форма
ИРИ – иммунорегуляторный индекс	%ПСАсв – соотношение свободной формы ПСА
ИРО – индекс роста опухоли	к общей, выраженное в процентах
ИФА – иммуноферментный анализ	ПТПП – паратириод-подобный протеин и его рецептор (ПТПП-Р1)
ИЭ – индекс эффективности	ПТПГ – паратириод-подобный гормон
ИП – импульсные последовательности	ПФОС – перфторорганические соединения
ИС – иммунная система	ППК – первичные половые клетки
ИФН- $\gamma$ – интерферон гамма	ПК – периферическая кровь
ККМ – критическая концентрация мицеллообразования	ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт
КРР – колоректальный рак	ПКГШ – плоскоклеточная карцинома головы и шеи
КРО – контроль роста опухоли	ПХТ – полихимиотерапия
КЗ – коллоидное золото	ПЭГ – полиэтиленгликоль
КОИР – коэффициент ориентировочно-исследовательской	ПЯ – палочкоядерный
реакции	РМЖ – рак молочной железы
КЭР – кардиоэзофагеальный рак	МР РМЖ – местнораспространенный РМЖ
ЛТ – лучевая терапия	ОИФ РМЖ – отечно-инфильтративная форма РМЖ
ЛМ – липосомальный митоксантрон	РЭС – ретикулоэндотелиальная система
ЛЛЛФ – лиофилизированной липосомальной ЛФ	ОАА – опухолеассоциированный антиген

РА – ревматоидный артрит  
PCO – раствор стандартного образца  
PKT – рентгеновская компьютерная томография  
РЛ – рак легкого  
РМП – рак мочевого пузыря  
РМЖ – рак молочной железы  
РП – рак почки  
РПК – рак прямой кишки  
РПЖ – рак поджелудочной железы  
PCO – рабочий стандартный образец  
РЭ – рецепторы эстрогенных гормонов  
РЭМП – расширенная экстирпация матки с придатками  
РЭС – ретикуло-эндотелиальная система  
РФ – ревматоидный фактор  
РФр – растворимые углеводные фракции  
НФр – нерастворимые углеводные фракции  
РЧА – эффективность радиочастотной абляции  
РШМ – рак шейки матки  
СВФ – стромально-васкулярная фракция  
СДЛВ – система доставки лекарственных веществ  
СИТ – специфическая иммунотерапия  
СК – селекартен  
СЗП – свежезамороженная плазма  
СО – суперинвазионный описторхоз  
СПК – суммарный полисахаридный комплекс  
СПС – сосудисто-подобные структуры  
СПЖ – средняя продолжительность жизни  
СЯ – сегментоядерный  
ТБК – 2-тиобарбитуровая кислота  
ТИК – тканеинженерная конструкция  
ТИМП – тканевые ингибиторы  
ТСХ – тонкослойная хроматография  
ТФ – транскрипционные факторы  
ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия  
ТЭОС – тетраэтилортосиликата  
ТЭС – телочья эмбриональная сыворотка  
УЗКТ – ультразвуковая компьютерная томография  
ФГА – фитогемагглютинин  
ФД – флуоресцентная диагностика  
ФИЦХ – флуоресцентной иммуноцитохимии  
ФР – факторы роста  
ФС – фотосенс  
ФСБ – фосфатно-солевой буфер  
ФСП – фармакопейная статья предприятия  
ФТ – фарнезил-трансфераза  
ФТС – фетальная телочья сыворотка  
ХГ – хорионический гонадотропин  
ХЛЛ – хронический лимфоцитарный лейкоз  
ХТ – химиотерапия  
ЛСП – лимфосаркома Плисса  
ЦП – церулоплазмин  
ЦТАБ – цетилтриметиламмонийбромид  
ЦФ – циклофосфан  
ЧО – частичный ответ  
ШМ – шейка матки  
ШО – шиффовые основания  
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота  
ЭФР – эпидермальный фактор роста  
ЭК – эндотелиальные клетки  
ЭМ – электронная микроскопия  
ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

fPSA – fPSA/tPSA

Akt – протеинкиназа B

AACR – American Association for Cancer Research

BMP-4 – bone morphogenetic protein-4

ADMET – drug administration, distribution, metabolism, excretion, and toxicological studies

ASCUS – atypical squamous cells of undetermined significance

AUC – Area Under the Curve

BCRP – breast cancer resistance protein

BDFI – bioactivity-directed fractionation and isolation

c-Kit – рецептор фактора стволовых клеток

CFSE – carboxyfluorescein diacetate succinimidyl este

CIN – cervical intraepithelial neoplasia

COX – циклооксигеназа

CRC – colorectal cancer

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста

EPCAM – adhesion molecule of epithelial cells

EPR effect – enhanced permeability and retention effect (эффект повышения проницаемости и удерживания)

EMT – Epithelio-mezenhimal transition

FAMMM-синдром – Familial Atypical Multiple Mole Melanoma syndrome

FLDF – freeze-dried liposomal drug formulation

FLICE – cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme

GAP – Good Agricultural Practice

GMP – Good Manufacturing Practice

GCP – Good Clinical Practice

GIST – гастроинтестинальные стромальные опухоли

IBC – inflammatory breast cancer

IC<sub>50</sub>-50% -ной ингибирующей концентрации ().

LDCI – Lomustine-Dacarbazine-Cisplatin-Ingaron

LLC – lung Lewis carcinoma (карцинома легких Льюис)

LSIL – low-grade intraepithelial lesions

MRP – multidrug resistance associated protein

MNNG – N-methyl-N<sup>1</sup>-nitro-N-nitrosoguanidine

mTOR – мишень рапамицина в клетках млекопитающих

Mw – molecular weight (молекулярный вес)

N-DMNA – N-dimethylnitrosoamine

NE – nucleic equivalents epitope

NER – nucleotide excision repair

NSE – нейроспецифической эналазы

NTA – nitril triacetate acid (нитрилтрехуксусная кислота)

IGFBP – insulin-like growth factor binding protein

HER – human epidermal growth factor receptor

HIF-1 $\alpha$  – индуцируемый гипоксией фактор 1 $\alpha$

HIF-1 – hypoxia-inducible factor 1

HSE – heat shock elements

HSIL – high-grade intraepithelial lesions

HSP90 – hot shock protein (белок теплового шока с ММ ~90 кДа)

MHC – major hystocompatibility complex

PARP – поли(АДФ-рибоза) полимеразы

PCa – prostate cancer

PDGF – тромбоцитарный фактор роста

PDGFR – рецептор тромбоцитарного фактора роста

PDT – photodynamic therapy

Pr – проспидин

PSA – prostate-specific antigen

tPSA – prostate-specific antigen, total form

fPSA – prostate-specific antigen, free form

PTHRP – parathyroid hormone-related protein

Ph – филадельфийская хромосома

Ph<sup>+</sup> – наличие филадельфийской хромосомы

PI3K – фосфоинозитид-3-киназа (фосфатидилинозитол 3-киназа)

RA – rheumatoid arthritis

RF – rheumatoid factor

ROC – анализ – Receiver Operating Characteristics curve analysis

ROS – reactive oxygen species

SAL – sterility assurance level

SCCA – антиген плоскоклеточной карциномы

SDD – systems delivery drugs

SSCP-анализ (single-strand conformation polymorphism analysis, анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма)

TGF – Transforming Growth Factors (трансформирующие факторы роста)

VM – vasculogenic mimicry