

ISSN 1726-9784 (Print)
ISSN 1726-9792 (Online)



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

Российский Биотерапевтический Журнал 2023 • ТОМ 22 • № 2



**Russian Journal
of Biotherapy**

2

ТОМ 22
2023

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

Журнал зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью цифрового идентификатора DOI.

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

теоретический и научно-практический рецензируемый журнал

Основная задача издания – публикация информации о современных достижениях в области изучения патогенеза, диагностики и терапии иммуноопосредованных и онкологических заболеваний, результатов научных исследований, национальных и международных доклинических и клинических исследований.

Цели журнала – информирование читателя о результатах изучения новых биомаркеров онкологических и иммуноопосредованных заболеваний, использования биомаркеров в диагностике и терапии злокачественных новообразований и патологий иммунной системы, исследований в области лекарственной и клеточной терапии, а также по вопросам технологии создания лекарств, биомедицинских клеточных продуктов и биоматериалов, проведения доклинических и клинических исследований новых препаратов и методов лечения; обобщение научных и практических достижений в области диагностики и терапии иммунологических и онкологических заболеваний.

ОСНОВАН В 2002 г. профессором А.Ю. Барышниковым

2 ^{ТОМ 22}
'23

Учредитель:
ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России

Адрес учредителя и редакции:
115522, Москва, Каширское
шоссе, 24, стр. 2.

Тел.: +7 (499) 324-10-65
Факс: +7 (499) 324-22-74

E-mail: biotherapy_rbj@mail.ru
rjournal@ronc.ru

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

Редактор Е.М. Печерская
Корректоры: Р.В. Журавлева,
Е.С. Самойлова

Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук

*Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых
коммуникаций. Регистрационный
номер: № 77-11695 от 21.01.2002 г.,
ПИ № ФС77-53039 от 04.03.2013 г.*

**При полной или частичной
перепечатке материалов
ссылка на журнал «Российский
биотерапевтический журнал»
обязательна.**

ISSN 1726-9784 (Print)
ISSN 1726-9792 (Online)

Российский биотерапевтический журнал.
2023. Том 22. № 2. 1–76.
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2023

Подписной индекс в каталоге агентства
«Роспечать» – 81679.

Отпечатано в типографии «Лайдер принт».
105082, Москва, Переведеновский пер., 13, стр. 16.

Тираж 1000 экз. Бесплатно.

<http://bioterapevt.elpub.ru>

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Киселевский Михаил Валентинович, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клеточного иммунитета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Караулов Александр Викторович, академик РАН, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

Шпрах Зоя Сергеевна, д.фарм.н., заведующая лабораторией химико-фармацевтического анализа ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, профессор кафедры фармацевтической технологии и фармакологии ИПО ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Соколова Зинаида Александровна, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Балдуева Ирина Александровна, д.м.н., доцент, заведующая научным отделом онкоиммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Бунятян Наталья Дмитриевна, д.фарм.н., профессор, главный научный сотрудник Центра клинической фармакологии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, заведующая кафедрой фармацевтической технологии и фармакологии ИПО ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

Голенков Анатолий Константинович, д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, профессор кафедры терапии, врач-гематолог отделения клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» (Москва, Россия)

Евсегнеева Ирина Валентиновна, д.м.н., профессор, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

Краснов Виктор Павлович, д.х.н., профессор, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией асимметрического синтеза Института органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения РАН (Екатеринбург, Россия)

Меерович Игорь Геннадьевич, к.б.н., научный сотрудник департамента фармации Eurofins Lancaster Laboratories, Inc. (Каламазу, США)

Мисюрин Андрей Витальевич, д.б.н., генеральный директор ООО «Генотехнология» (Москва, Россия)

Набиев Игорь Руфаилович, д.х.н., профессор, профессор лаборатории по исследованиям в области нанонаук Реймского университета (Реймс, Франция), ведущий ученый лаборатории нано-биоинженерии Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ» (Москва, Россия)

Новиков Виктор Владимирович, д.б.н., профессор, профессор кафедры молекулярной биологии и иммунологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, заведующий лабораторией иммунохимии ФБУН «Нижегородский Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» (Нижний Новгород, Россия)

Оборотова Наталия Александровна, д.фарм.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Панкратов Андрей Александрович, к.б.н., руководитель отделения модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии Московского научного исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России (Москва, Россия)

Петров Александр Юрьевич, д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой фармации и химии Уральского государственного медицинского университета (Екатеринбург, Россия)

Рапопорт Наталья Яковлевна, д.х.н., профессор, почетный профессор департамента биомедицинской инженерии Университета Юты (Солт-Лейк-Сити, США)

Соколова Татьяна Михайловна, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)

Степанова Евгения Владиславовна, д.м.н., советник вице-президента РАН (Москва, Россия)

Титов Константин Сергеевич, д.м.н., профессор кафедры онкологии и рентгенодиагностики Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», президент АНО «Национальный Альянс специалистов по опухолям наружных локализаций» (Москва, Россия)

Уласов Илья Валентинович, д.б.н., ведущий научный сотрудник, лидер группы экспериментальной биотерапии и диагностики Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

Эстрин Юрий Захарович, д.ест.н., почетный доктор РАН, действительный член Австралийской академии наук, иностранный член РАН, профессор департамента материаловедения и инжиниринга Университета им. Монаша (Клэйтон, Австралия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Барышникова Мария Анатольевна, к.фарм.н., заведующая лабораторией экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Бочарова Ольга Алексеевна, д.б.н., профессор, заведующая лабораторией иммунофармакологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Демидов Лев Вадимович, д.м.н., профессор, заведующий хирургическим отделением № 10 биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Иванов Павел Константинович, д.м.н., заведующий лабораторией медицинской биотехнологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кадагидзе Заира Григорьевна, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник централизованного клинико-лабораторного отдела ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Косоруков Вячеслав Станиславович, к.б.н., директор НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кубасова Ирина Юрьевна, к.м.н., ученый секретарь ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Тупицын Николай Николаевич, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией иммунологии гемопоза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Шубина Ирина Жановна, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

Russian Journal of Biotherapy

Peer-reviewed theoretical and SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

The main objective of Russian Journal of Biotherapy is a publication of current achievements in the study of pathogenesis, diagnostics, and therapy of immune-mediated and oncological diseases, results of the research studies, and results of national and international pre-clinical and clinical studies.

The publication aim is to present the results of the studies of new biomarkers of oncological and immune diseases, the use of biomarkers in diagnostics and therapy of tumors and disorders of the immune system, studies in the field of drug and cell therapy, studies of drug development technologies, biomedical cell products and biomaterials, pre-clinical and clinical studies of new medicines and methods of treatment. The main focus of the journal is to summarize scientific and practical achievements in the field of immunological and oncological diseases therapy.

FOUNDED IN 2002 by Professor A.Yu. Baryshnikov

2 VOL. 22
'23

Founder:

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation

Founder and editorial office:

Bld. 2, 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115522.

Tel.: +7 (499) 324-10-65
Fax: +7 (499) 324-22-74

e-mail: biotherapy_rbj@mail.ru
rbjournal@ronc.ru

Publishing office:

Research Institute of Carcinogenesis, Floor 3, Bld. 15, 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478.

Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru

www.abvpress.ru

Editor E.M. Pecherskaya

Proofreaders: R.V. Zhuravleva, E.S. Samoylova

**Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk**

The journal is registered

at the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media

Registration number: ПИИ № 77-11695 dated 21.01.2002;

ПИИ № ФС77-53039 dated 04.03.2013

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

ISSN 1726-9784 (Print)

ISSN 1726-9792 (Online)

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal. 2023. Volume 22. No 2. 1–76.

© PH "ABV-Press", 2023

Rospechat' catalogue index: 81679.

Printed at the Leader Print Ltd Bld. 16, 13 Perevedenovsky lane, Moscow 105082.

1,000 copies. Free distribution

<http://bioterapevt.elpub.ru>

EDITOR-IN-CHIEF

Kiselevskiy, Mikhail V., PhD, DSc, Professor, Head of Laboratory of Cell Immunity, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

DEPUTIES EDITOR-IN-CHIEF

Karaulov, Alexander V., Academician of the Russian Academy of Sciences, PhD, DSc, Professor, Head of Chair of Clinical Immunology and Allergology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Shprakh, Zoya S., PhD, DSc, Head of Laboratory of Chemical-Pharmaceutical Analysis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, Professor of Chair of Pharmaceutical Technology and Pharmacology of the Institute of Professional Education, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

EXECUTIVE EDITOR

Sokolova, Zinaida A., PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Experimental Diagnostic and Biotherapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

Baldueva, Irina A., PhD, DSc, Associate Professor, Head of Research Department of Oncoimmunology, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)

Bunyatyay, Natalia D., PhD, DSc, Professor, Major Researcher of Center of Clinical Pharmacology, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Health of Russia, Head of Chair of Pharmaceutical Technology and Pharmacology of the Institute of Professional Education, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Golenkov, Anatoly K., MD, PhD, DSc, Professor, Honored Doctor of the Russian Federation, Professor of Chair of Therapy, Doctor Hematologist of Department of Clinical Hematology and Immunotherapy, M.F. Vladimirsky Moscow Region Scientific Research Clinical Institute (MONIKI) (Moscow, Russia)

Evsegneeva, Irina V., MD, PhD, DSc, Professor, Professor of Chair of Clinical Immunology and Allergology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Krasnov, Viktor P., PhD, DSc, Professor, Major Researcher, Head of Laboratory of Asymmetrical Synthesis, I. Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of Russian Academy of Sciences (Ekaterinburg, Russia)

Meerovich, Igor G., PhD, Scientist II of Pharma Department, Eurofins Lancaster Laboratories, Inc. (Kalamazoo, USA)

Misyurin, Andrey V., PhD, DSc, General Director of LLC «Gene Technology» (Moscow, Russia)

Nabiev, Igor R., PhD, DSc, Professor, Professor of Laboratory of Studies in the Field of Nanoscience, University of Reims (Reims, France), Leading Scientist of Laboratory Nano-Bioengineering, National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute) (Moscow, Russia)

Novikov, Viktor V., PhD, DSc, Professor, Professor of Chair of Molecular Biology and Immunology of the Institute of Biology and Biomedicine, N.I. Lobachevsky Nizhegorodsky State University, Head of Laboratory of Immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (Nizhny Novgorod, Russia)

Oborotova, Natalia A., PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of Laboratory of Development of Drug Forms, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Pankratov, Andrey A., PhD, Chief of Department of Modifiers and Protectors of Anti-tumor Therapy, P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Petrov, Alexander Yu., PhD, DSc, Professor, Head of Chair of Pharmacy, Ural's State Medical University (Ekaterinburg, Russia)

Rapoport, Natalya Ya., PhD, DSc., Research Professor Emerita, Department of Biomedical Engineering, University of Utah (Salt Lake City, USA)

Sokolova, Tatiana M., PhD, DSc, Leading Researcher of Laboratory of Cell Engineering, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Stepanova, Eugenia V., PhD, DSc, Advisor to the Vice-President of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia)

Titov, Konstantin S., MD, PhD, DSc, Professor of Department of Oncology and Radiology of the Institute of Medicine, RUDN University, President of the National Alliance of Specialists in Tumors of External Localization (Moscow, Russia)

Ulasov, Ilya V., PhD, DSc, *Leading Researcher, Leader of the Experimental Biotherapy and Diagnostics Group of the Institute of Regenerative Medicine, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)*

Estrin, Yuri Z., PhD, DSc, *Honorary Doctor of the Russian Academy of Sciences, Fellow of the Australian Academy of Science, Foreign member of the Russian Academy of Sciences, Professor of Department of Materials Science and Engineering, Monash University (Clayton, Australia)*

EDITORIAL COUNCIL

Baryshnikova, Maria A., PhD, *Head of Laboratory of Experimental Diagnostic and Biotherapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Bocharova, Olga A., PhD, DSc, *Professor, Head of Laboratory of Immunopharmacology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Demidov, Lev V., MD, PhD, DSc, *Professor, Head of Surgical Department No 10 of Biotherapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Ivanov, Pavel K., PhD, DSc, *Head of Laboratory of Medical Biotechnology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Kadagidze, Zaira G., MD, PhD, DSc, *Professor, Leading Researcher of Centralized Clinical-Laboratory Department, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Kosorukov, Vyacheslav S., PhD, *Director of Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Kubasova, Irina Yu., PhD, *Scientific Registrar, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Tupitsyn, Nikolay N., PhD, DSc, *Professor, Head of Laboratory of Immunology of Hematopoiesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Shubina, Irina Zh., PhD, DSc, *Leading Researcher, Laboratory of Cell Immunity, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

А.Д. Ширин, О.Ю. Баранова, В.В. Решетникова

Иммунологические аспекты трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при опухолях гемопоэтической ткани и некоторые особенности радиоиммунотерапии онкологических заболеваний 10

*Ю.В. Алдушкина, Н.Ю. Анисимова, А.Н. Грицай, К.М. Новрузов,
Ю.И. Должикова, О.А. Одарюк, Д.В. Филоненко*

Клиническая значимость обнаружения микрометастазов в лимфатических узлах при раке яичников 20

*А.В. Шабунин, В.В. Птушкин, М.М. Тавобилов, К.С. Титов,
Ю.Н. Кобзев, А.А. Карпов, Е.Б. Кудряш*

Роль циркулирующей опухолевой ДНК в диагностике и оптимизации лечения локализованного и местно-распространенного рака поджелудочной железы 27

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

А.Г. Абдуллаев, Н.А. Козлов, И.С. Стилиди

Рак желудка и мезотелиома брюшины – редкий случай синхронного рака. Клиническое наблюдение 34

С.С. Шушанов, Ю.Б. Черных, Т.А. Захарова, Н.П. Акентьева

Количественное соотношение экспрессии мРНК генов рецепторов системы IGF/INS при множественной миеломе 41

О.Д. Гурьева, М.И. Савельева, Ж.А. Созаева, Т.Т. Валиев

Взаимосвязь полиморфизмов генов белков-переносчиков *SLCO1B1* и *ABCB1* с клиническими вариантами токсичности метотрексата при терапии острого лимфобластного лейкоза у детей 53

Н.Н. Тупицын, Е.Э. Толстых

Экспрессия $\beta 2$ -микроглобулина на злокачественных плазматических клетках множественной миеломы 60

*С.П. Кречетов, М.С. Масленникова, А.Ю. Куксин, А.Д. Малинкин,
Н.Л. Соловьева, И.И. Краснюк*

Получение и исследование свойств композиций ресвератрола с солюбилизаторами 65

ЮБИЛЕЙ

К 70-летию Александра Викторовича КАРАУЛОВА 74

REVIEWS

Anton D. Shirin, Olga Yu. Baranova, Vera V. Reshetnikova
Immunological aspects of hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies and some immunological peculiarities of cancer radioimmunotherapy 10

Yulia Yu. Aldushkina, Natalia Yu. Anisimova, Anatolii N. Gritsai, Keryam M. Novruzov, Yulia I. Dolzhikova, Oksana A. Odaryuk, Dmitry V. Filonenko
Clinical significance of detection of micrometastases in lymph nodes in ovarian cancer 20

Aleksey V. Shabunin, Vadim V. Ptushkin, Michail M. Tavobilov, Konstantin S. Titov, Jury N. Kobzev, Alexey A. Karpov, Evgeny B. Kudryash
The role of circulating tumor DNA in diagnosis and optimization of treatment of localized and local pancreatic cancer 27

ORIGINAL REPORTS

Amir G. Abdullaev, Nikolay A. Kozlov, Ivan S. Stilidi
Gastric carcinoma and peritoneal mesothelioma – a rare case of synchronous cancer. Clinical observation 34

Sain S. Shushanov, Yulia B. Chernykh, Tatiana A. Zakharova, Natalia P. Akentieva
Quantitative ratio of mRNA expression of IGF/INS system receptors in multiple myeloma 41

Oksana D. Gurieva, Marina I. Savelyeva, Zhanna A. Sozaeva, Timur T. Valiev
Relationship of *SLCO1B1* and *ABCB1* gene polymorphisms with clinical variants of methotrexate toxicity in pediatric acute lymphoblastic leukemia therapy 53

Nikolay N. Tupitsyn, Elena E. Tolstykh
Expression of $\beta 2$ microglobulin on malignant multiple myeloma plasma cells 60

Sergey P. Krechetov, Maria S. Maslennikova, Aleksey Yu. Kuksin, Aleksey D. Malinkin, Natalia L. Solovieva, Ivan I. Krasnyuk
Preparation and investigation of properties of resveratrol and solubilizers compositions 65

JUBILEE

To the 70th anniversary of Alexander Viktorovich KARAULOV 74

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-2-10-19>

Иммунологические аспекты трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при опухолях гемопоэтической ткани и некоторые особенности радиоиммунотерапии онкологических заболеваний

А.Д. Ширин, О.Ю. Баранова, В.В. Решетникова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Антон Дмитриевич Ширин shirin-anton@mail.ru

В настоящем обзоре литературы приведены основные сведения о роли трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в лечении миелодиспластических синдромов, острых миелоидных лейкозов и острых лимфобластных лейкозов; указаны рекомендации по применению трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Рассмотрены режимы кондиционирования (миелоаблативной, немиелоаблативной, сниженной интенсивности), их достоинства и недостатки, а также освещены вопросы профилактики и лечения реакции «трансплантат против хозяина», включая подготовку трансплантата (деплецию Т-клеток), экстракорпоральный фотоферез и механизмы реакции «трансплантат против опухоли (лейкоза)». Отражены исторические вехи развития иммунотерапии, создания терапевтических моноклональных антител, разработки таргетной терапии, например конъюгатов моноклональных антител с цитостатиками и радионуклидами (таргетная радионуклидная терапия). Представлена информация о радиоиммунотерапии как методе, применяемом для лечения солидных опухолей и неходжкинских лимфом, а также об использовании мезенхимальных стволовых клеток для лечения и профилактики реакции «трансплантат против хозяина».

Ключевые слова: онкология, трансплантация стволовых клеток, режимы кондиционирования, трансплантат против хозяина, моноклональные антитела

Для цитирования: Ширин А.Д., Баранова О.Ю., Решетникова В.В. Иммунологические аспекты трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при опухолях гемопоэтической ткани и некоторые особенности радиоиммунотерапии онкологических заболеваний. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(2):10–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-2-10-19

Immunological aspects of hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies and some immunological peculiarities of cancer radioimmunotherapy

Anton D. Shirin, Olga Yu. Baranova, Vera V. Reshetnikova

N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia

Contacts: Anton Dmitrievich Shirin shirin-anton@mail.ru

This literature review provides basic information about the role of hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of myelodysplastic syndromes, acute myeloid leukemia, acute lymphoblastic leukemia. The recommendations for the use of stem cell transplantation are indicated. Conditioning regimens (myeloablative, non-myeloablative, reduced intensity), their advantages and disadvantages are considered. The issues of prevention and treatment of graft-versus-host disease, including graft preparation (T-cell depletion), extracorporeal photopheresis and mechanisms of graft-versus-tumor (-leukemia) reaction are highlighted. The historical milestones of the

immunotherapy development, the creation of therapeutic monoclonal antibodies, the development of targeted therapy, for example, conjugates of monoclonal antibodies with cytostatic drugs and radionuclides (targeted radionuclide therapy) are reported. Information about radioimmunotherapy as a method used for treatment of solid tumors and non-Hodgkin's lymphoma, and information on the use of mesenchymal stem cells for the treatment and prevention of the graft-versus-host reaction are presented.

Keywords: oncology, stem cell transplantation, conditioning regimens, graft-versus-host, monoclonal antibodies

For citation: Shirin A.D., Baranova O.Yu., Reshetnikova V.V. Immunological aspects of hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies and some immunological peculiarities of cancer radioimmunotherapy. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(2):10–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-2-10-19

Введение

Для целого ряда опухолей гемопоэтической и лимфоидной тканей, включая миелодиспластические синдромы (МДС), острые миелоидные лейкозы (ОМЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) из группы высокого риска у взрослых и детей, эффективным методом, позволяющим излечить больного или существенно увеличить продолжительность жизни, является аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК), цель которой – замена кроветворной системы реципиента на донорскую [1]. Перед алло-ТГСК осуществляются различные режимы кондиционирования. В будущем не исключено дополнение режимов кондиционирования иммуноконъюгатами, включая препараты для таргетной радионуклидной терапии. Пожалуй, основным осложнением алло-ТГСК служит реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ). С целью профилактики РТПХ может осуществляться предварительная подготовка трансплантата *ex vivo* (деплеция Т-клеток трансплантата).

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток при миелодиспластических синдромах, острых миелоидных лейкозах, остром лимфобластном лейкозе

Гемопоэтические стволовые клетки для трансплантации могут быть получены из костного мозга, периферической или пуповинной крови [2]. Последний вариант алло-ТГСК используется редко. Видом алло-ТГСК служит трансплантация от гомозиготного (однойящевое) близнеца – сингенная трансплантация. При этом типе алло-ТГСК донором выступает полностью (100 %) генетически и иммунологически идентичный реципиент. Крайне редко при ОМЛ, ОЛЛ и МДС может применяться аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) (собственных гемопоэтических стволовых клеток) при отсутствии признаков поражения костного мозга, т.е. в период ремиссии, как этап консолидации в терапии заболевания [3, 4]. Проведение алло-ТГСК не всегда возможно в связи с пожилым возрастом большинства больных с МДС, общим со-

стоянием, особенностями заболевания и отсутствием HLA-совместимого (-идентичного) донора.

В качестве источников аллогенных гемопоэтических стволовых клеток в зависимости от степени совместимости по генам HLA-системы могут быть:

- HLA-совместимый (полностью совместимый по основным генам HLA-системы) родственный донор, т.е. донор-сиблинг (брат, сестра от общих родителей);
- HLA-совместимый неродственный донор;
- частично HLA-совместимый неродственный донор;
- не полностью HLA-совместимый родственный гаплоидентичный донор (брат/сестра, мать/отец, ребенок пациента);
- донор пуповинной (плацентарной) крови, взятой из сосудов плаценты и пуповины после рождения ребенка.

В последнее время начались клинические исследования по трансплантации мезенхимальных стволовых клеток для нивелирования РТПХ и приживления гемопоэтических стволовых клеток [5].

По данным регистра Европейского общества по трансплантации костного мозга (European Society for Blood and Marrow Transplantation, EBMT) от 2020 г., было проведено 740 тыс. трансплантаций, из них 16 105 аллогенных и 20 758 аутологичных. По поводу ОМЛ и связанных с ними неоплазий из клеток-предшественниц выполнено 5820 алло-ТГСК и 151 ауто-ТГСК, по поводу новообразований из лимфоидных предшественников, т.е. ОЛЛ/лимфом, выполнено 2421 алло-ТГСК и 47 ауто-ТГСК [6].

Алло-ТГСК на сегодняшний день является наиболее радикальным методом лечения многих пациентов с МДС, ОМЛ и ОЛЛ, по крайней мере методом терапии, позволяющим надеяться на полное излечение (достижение длительной безрецидивной выживаемости) [7, 8]. Однако применение алло-ТГСК при МДС в значительной степени ограничено пожилым возрастом пациентов (только 25 % больных моложе 60 лет). При МДС алло-ТГСК является лечебной опцией для пациентов из группы высокого риска, в то время как в группе промежуточного риска по шкале IPSS-R (International Prognostic Scoring

System Revised) принятие решения остается более сложным [2]. Алло-ТГСК от HLA-совместимого сиблинга, HLA-совместимого неродственного донора или альтернативного донора (включая гаплоидентичного члена семьи или донора клеток пуповинной крови) является предпочтительной опцией для лечения отдельных пациентов с МДС, особенно из группы высокого риска. Рекомендуется раннее направление на обследование для предстоящей трансплантации с целью своевременного перехода к этому методу лечения. Рекомендуется предтрансплантационная противоопухолевая терапия для снижения числа бластных клеток костного мозга до уровня $<5\%$ с целью уменьшения рецидива после трансплантации. Предтрансплантационная подготовка пациента особенно важна при планировании режима кондиционирования с редуцированной (сниженной) интенсивностью (редуцированная интенсивность кондиционирования, РИК). В некоторых медицинских учреждениях невозможность снижения уровня бластных клеток $<5\%$ с помощью циторедукции не является препятствием к трансплантации, поскольку в этих случаях трансплантация, по-видимому, также повышает показатели выживаемости [9].

При ОМЛ у молодых пациентов на этапе консолидации ремиссии выполняется алло-ТГСК, значительно реже – ауто-ТГСК. При сравнении ауто-ТГСК и алло-ТГСК в некоторых исследованиях дизайн не подходил для оценки разницы в безрецидивной выживаемости. В исследовании EORTC-LG/GIMEMAAML-10 [10] пациентам при наличии родственного донора осуществлялась алло-ТГСК. Всем пациентам без родственного донора выполнялась ауто-ТГСК. Группы цитогенетического риска: «хороший» – наличие $t(8;21)$ или $inv(16)$; промежуточный – нормальный кариотип или только $-Y$; «плохой» – наличие других аномалий кроме указанных в группе «хороший» и «очень плохой»; очень плохой – наличие $-5, 5q-, -7, 7q-$, сложный кариотип, аномалии $3q, t(9;22), t(6;9)$ или аномалии $11q23$ и отсутствие признаков для группы «хороший» риск. В группе пациентов с цитогенетикой плохого риска после алло-ТГСК частота 4-летней безрецидивной выживаемости составила 43% , что было значительно выше, чем в группе после ауто-ТГСК (18% , $p = 0,008$). Частота 4-летней безрецидивной выживаемости среди пациентов с ОМЛ промежуточного риска составила 45% в группе после алло-ТГСК и $48,5\%$ в группе после ауто-ТГСК. Частота рецидивов составила 35% и 47% соответственно. Показатель частоты 4-летней общей выживаемости среди пациентов промежуточного риска составил 53% в группе после алло-ТГСК и 54% в группе после ауто-ТГСК.

В течение последнего десятилетия было показано, что «нормальная» цитогенетика охватывает несколько молекулярных аномалий, характеризующихся

разным клиническим течением. Наличие изолированной мутации *NPM1* или биаллельной мутации *CEBPA* характеризуется лучшим прогнозом, чем у пациентов с транслокациями *CBF*.

Согласно рекомендациям Европейской организации по изучению и лечению лейкозов (European LeukemiaNet, ELN) 2011 г. [11] разработана стандартизированная отчетность для сопоставления результатов цитогенетических и молекулярно-генетических исследований с клиническими данными при ОМЛ. В ней учитываются молекулярные факторы с мутациями *FLT3-ITD*, *NPM1* и *CEBPA*, которые являются наиболее частыми и прогностически значимыми абберациями. Согласно этой отчетности, выделяют 4 группы риска (ELN genetic risk groups): группа благоприятного риска, промежуточного I, промежуточного II, неблагоприятного.

У пожилых пациентов (старше 60 лет) применение миелоаблативной алло-ТГСК ограничено из-за сопутствующих заболеваний. Следует отметить постоянный интерес к алло-ТГСК с РИК в качестве консолидирующей терапии. Согласно данным регистра, показатель 2-летней общей выживаемости составляет от 40% до 60% , а смертность вне рецидива у пациентов, перенесших трансплантацию в стадии ремиссии, – 20% . В ретроспективном анализе сравнивались результаты алло-ТГСК с РИК и ауто-ТГСК у пациентов в возрасте ≥ 50 лет. Алло-ТГСК с РИК была связана с более низким риском рецидива и превосходящими показателями безрецидивной и общей выживаемости по сравнению с ауто-ТГСК. В рекомендациях Национальной сети по борьбе с раком (National Comprehensive Cancer Network, NCCN) подчеркивается, что алло-ТГСК с РИК рассматривается как дополнительный вариант для пациентов в возрасте ≥ 60 лет в качестве постремиссионной терапии после достижения полной ремиссии [12].

Согласно рекомендациям EBMT 2022 г. в целом алло-ТГСК в период первой полной ремиссии следует проводить при ОМЛ с неблагоприятным и промежуточным риском (по определению стратификации риска ELN), в то время как для больных ОМЛ с благоприятным течением заболевания она не рекомендуется. Алло-ТГСК может быть эффективной опцией у пациентов с первично-рефрактерным ОМЛ (определяемым как неспособность достигнуть полного ответа после 2 циклов индукционной химиотерапии) и рецидивирующим течением ОМЛ, особенно после достижения второй полной ремиссии. Пациентам с резистентным заболеванием следует рассмотреть вопрос о новых подходах к трансплантации, включая клинические испытания CAR-T-клеток [2].

Пациенты с ОМЛ из благоприятной группы риска также могут быть рассмотрены для ауто-ТГСК, особенно если они имеют негативный статус в отношении

минимальной остаточной болезни (МОБ) после индукционной терапии, в то время как больные с персистирующей МОБ должны рассматриваться для осуществления алло-ТГСК [2].

Что касается ОЛЛ, алло-ТГСК выполняется в качестве консолидирующей терапии [13]. Алло-ТГСК должна быть основной частью терапии после этапа консолидации у подростков и взрослых пациентов с признаками высокого риска, включая ОЛЛ с t(9;22) (q34.1;q11.2)/BCR-ABL1 (Ph⁺-ОЛЛ), BCR-ABL1-подобный ОЛЛ или наличие персистирующей МОБ [14].

Примечательно, что, хотя у более молодых пациентов смертность, связанная с трансплантацией, может быть ниже, пожилой возраст как таковой не является противопоказанием к ТГСК. По этой причине следует рассмотреть вопрос об HLA-типировании и направлении на трансплантацию всех пациентов с впервые установленным диагнозом или с рецидивом, которым ранее не проводилась ТГСК, чтобы осуществить своевременный поиск донора. Для пациентов в состоянии полной ремиссии рекомендуется дополнительная терапия для устранения МОБ перед трансплантацией. Переход к алло-ТГСК с наличием МОБ не является оптимальным.

Имеются данные, свидетельствующие о том, что при ОЛЛ с t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR-ABL1 для более молодых пациентов (возраст ≤21 года), особенно для тех, у кого достигнут отрицательный результат по МОБ, алло-ТГСК может не обладать преимуществом по сравнению с химиотерапией + ингибиторы тирозинкиназы. В работе по ретроспективному анализу результатов лечения детей с Ph⁺-ОЛЛ, получавших интенсивные схемы химиотерапии с алло-ТГСК или без нее, 7-летние показатели бессобытийной и общей выживаемости составили 25 и 36 % соответственно. Это преимущество при использовании ТГСК по сравнению только с химиотерапией не наблюдалось при выполнении ауто-ТГСК или при алло-ТГСК от HLA-совместимого неродственного донора. Это исследование показало, что алло-ТГСК от HLA-совместимого (-идентичного) сиблинга имеет преимущества перед только химиотерапией. Алло-ТГСК считалась стандартом лечения подростков с Ph⁺-ОЛЛ, однако ее роль стала менее ясной с появлением BCR-ABL-таргетных ингибиторов тирозинкиназы. В нескольких исследованиях оценивались алло-ТГСК в эпоху иматиниба и роль ингибиторов тирозинкиназы в улучшении результатов лечения с использованием ТГСК.

У пациентов подросткового возраста с Ph⁻-ОЛЛ в первой полной ремиссии алло-ТГСК может быть рассмотрена в случаях высокого риска. Систематический обзор и метаанализ рандомизированных исследований по постремиссионной индукционной терапии взрослых с ОЛЛ показали значительное сни-

жение смертности от всех причин при проведении алло-ТГСК в период первой полной ремиссии по сравнению с ауто-ТГСК или только химиотерапией.

Помимо этого, при рефрактерном/резистентном течении заболевания, если вторая ремиссия достигнута до ТГСК и у пациента ранее не было трансплантации, то ТГСК рекомендуется в качестве консолидационной терапии. Для пациентов с рецидивом ОЛЛ после алло-ТГСК может быть рассмотрена вторая алло-ТГСК и/или инфузия донорских лимфоцитов.

Согласно рекомендациям EBMT 2022 г. ТГСК выполняется при следующих злокачественных опухолях гемопоэтической и лимфоидной тканей: ОМЛ, ОЛЛ, хронический миелоидный лейкоз, миелофиброз (первичный или вторичный), МДС, хронический миеломоноцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, крупноклеточная В-клеточная лимфома, фолликулярная лимфома, лимфома из клеток мантии, макроглобулинемия Вальденстрема (лимфоплазмочитарная лимфома с секрецией моноклонального иммуноглобулина М), периферическая Т-клеточная лимфома, первичная кожная Т-клеточная лимфома, лимфома Ходжкина, множественная миелома [2].

Перед ТГСК выполняются различные режимы кондиционирования, предусматривающие цитостатическую (химио- и/или лучевую) терапию для подготовки к инфузии аутологичных или аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Эта подготовка преследует 2 цели: эрадикация опухоли, создание нового плацдарма кроветворения и индукция иммуносупрессии, достаточной для приживания донорских гемопоэтических стволовых клеток при алло-ТГСК [15, 16].

Режимы кондиционирования

Интенсивность режима кондиционирования определяется двумя основными характеристиками: миелосупрессией (миелоаблативность режима) и иммуносупрессией. Соответственно, режим кондиционирования может быть миелоаблативным (миелоаблативное кондиционирование, МАК), т. е. не только максимально разрушающим опухоль, но и повреждающим костный мозг больного, или немиелоаблативным (немиелоаблативное кондиционирование, НМАК), а также сниженной интенсивности. МАК — это высокодозный режим химиотерапии, состоящий из 1 агента или комбинации агентов, которые уничтожают гемопоэтические клетки пациента в костном мозге и вызывают длительную аплазию (панцитопению и гипоплазию костного мозга). Хотя МАК обеспечивает быстрое приживание гемопоэтических донорских клеток, оно связано с миелотоксичностью и значительной смертностью. При НМАК основной расчет обычно делается на эффект «трансплантат против опухоли»

(ТПО) восстановленных донорских иммунных клеток для ликвидации основного заболевания, а выраженно-го угнетения кроветворения не предполагается [16]. Для поддержки аллотрансплантата и эффекта ТПО после НМАК в посттрансплантационный период могут применяться инфузии лимфоцитов донора. Такая стратегия используется в основном при лечении солидных опухолей с неблагоприятным прогнозом, например меланомы.

Режим кондиционирования сниженной интенсивности направлен на устранение недостатков МАК и НМАК. Концепция РИК основана на идее предотвращения высокой токсичности и смертности, связанных с МАК, у пациентов пожилого возраста или с соответствующими сопутствующими заболеваниями, при этом обеспечивая достаточную иммуноабляцию для предотвращения отторжения трансплантата [15]. Основные характеристики режимов кондиционирования представлены в таблице.

После алло-ТГСК с МАК обычно наблюдается быстрое приживление донорских клеток. Опасения, связанные с применением МАК, чаще всего ассоци-

ировались с токсичностью и острой РТПХ. Однако летальность, связанная с трансплантацией, в большей степени зависит не от режима кондиционирования, а от таких характеристик, как возраст и пол пациента и донора, степень HLA-идентичности, период течения основного заболевания, а также период выполнения ТГСК. Риски летальности, связанной с трансплантацией, после МАК снизились с течением времени благодаря совершенствованию технологий HLA-типирования и сопроводительной терапии. Очевидно, что наибольшее преимущество от этого получают пациенты с ранними стадиями заболевания. Противоопухольевый эффект схем МАК гипотетически может быть расширен путем использования радиоиммунотерапии, место которой в трансплантологии предстоит изучить [16].

Радиоиммунотерапия

Радиоиммунотерапия (таргетная радионуклидная терапия) – перспективная разновидность таргетной терапии, в которой используются моноклональные антитела, меченные радионуклидом, направленные

Режимы кондиционирования

Conditioning regimens

Интенсивность Intensity	Режим Regimen	Комментарии Comments
Миелоаблативная Myeloablative	ЦФ/ТТО CY/TBI	Максимальная переносимая доза ТТО – 16,00 Гр в сочетании с ЦФ в дозе 120 мг/кг Maximum tolerated dose of TBI 16,00 Gy given with CY 120 mg/kg
	Бу/ЦФ BU/CY	Комбинация Бу в дозе 16 мг/кг в течение 4 дней с ЦФ в суммарной дозе 200 мг/кг в течение 4 дней (режим БуЦФ4) была чрезмерно токсичной, и доза ЦФ позже была редуцирована до 60 мг/кг в течение 2 дней, а режим назван БуЦФ2 The combination of BU at a dose of 16 mg/kg for 4 days with CY at a dose of 200 mg/kg divided in four daily doses (BuCy4 regimen) was unacceptably toxic and the CY dose was later reduced to 60 mg/kg for 2 days, and the regimen was called BuCy2
Немиелоаблативная Non-myeloablative	Ф/ТТО FLU/TBI	Режим Ф/ТТО состоит из Ф (25–30 мг/м ² /3 дня) и ТТО 2 Гр Regimen FLU/TBI consisted of FLU (25–30 mg/m ² /3 days) and 2 Gy TBI
	ОЛК/АТГ TLI/ATG	ОЛК осуществлялось в суммарной дозе 8 Гр, доза АТГ – 7,5 мг/кг TLI in total dose 8 Gy, ATG 7,5 mg/kg
	ТТОНМД Low dose TBI	ТТОНМД осуществляется в суммарной дозе ≤2 Гр Low dose TBI in total dose ≤2 Gy
Редуцированная Reduced intensity	Ф/М FLU/MEL	Общая доза Ф – до 180 мг/м ² , М – до 140 мг/м ² Total dose of FLU is up to 180 mg/m ² , MEL is up to 140 mg/m ²
	Ф/Бу FLU/BU	Общая доза Ф – до 180 мг/м ² , Бу – до 10 мг/кг Total dose of FLU is up to 180 mg/m ² , BU is up 10 mg/kg
	Ф/ЦФ FLU/CY	Общая доза Ф – до 180 мг/м ² , ЦФ – до 120 мг/кг Total dose of FLU is up to 180 mg/m ² , CY is up 120 mg/kg

Примечание. Гр – Грей; ЦФ – циклофосфамид; ТТО – тотальное терапевтическое облучение тела; ТТОНМД – тотальное терапевтическое облучение тела с низкими мощностями дозы; Бу – бусульфан; Ф – флударабин; ОЛК – облучение всех лимфатических узлов или коллекторов; АТГ – антитимоцитарный иммуноглобулин; М – мелфалан.

Note. Gy – Gray; CY – cyclophosphamide; TBI – total body irradiation; Low dose TBI – total body irradiation with low dose rates; BU – busulfan; FLU – fludarabine; TLI – total lymphoid irradiation; ATG – antithymocyte globulin; MEL – melphalan.

против опухолеассоциированных антигенов. Наиболее часто используются радионуклиды, являющиеся источниками α - и β -излучения. Способность антитела специфически связываться с опухолеассоциированным антигеном приводит к целенаправленному воздействию ионизирующего излучения на опухолевые клетки, не затрагивая при этом интактные ткани. Особое внимание уделяется изучению возможности клинического применения данного вида системного лечения у пациентов как с онкогематологическими заболеваниями, так и с солидными опухолями. Принцип высокоспецифичного взаимодействия антитела с антигеном послужил основой для проведения доклинических и клинических исследований, направленных на изучение возможности их использования в качестве «транспорта» для доставки радионуклидов к опухолевым клеткам и, соответственно, радиационного цитотоксического воздействия [17]. В отличие от опухолевых заболеваний системы крови, проведение радиоиммунотерапии при солидных опухолях оказалось менее эффективным.

Эффективность клинического применения радиоиммунотерапии исследовалась при злокачественных новообразованиях различных локализаций, включая опухоли желудочно-кишечного тракта, нервной системы, а также органов репродуктивной системы. Так, большой интерес представляет изучение возможностей данного вида направленной терапии у пациентов с колоректальным раком, при котором в качестве основных мишеней рассматриваются раково-эмбриональный антиген и опухолеассоциированный муциноподобный гликопротеин (TAG-72) [18].

Наибольшее внимание в качестве мишени воздействия при раке яичников уделяется изучению трастузумаба, представляющего собой гуманизированное моноклональное антитело, направленное против экстрацеллюлярного домена эпидермального ростового фактора человека 2-го типа (HER2/neu). Обычно гиперэкспрессия этого антигена отмечается на поверхности опухолевых клеток при раке молочной железы, яичников и желудка. В результате экспериментальных исследований показана возможность конъюгирования трастузумаба с такими радионуклидами, как ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{225}Ac и ^{227}Th . В ходе доклинических исследований были протестированы актиний-225 (^{225}Ac), конъюгированный с соединениями ПСМА-617 (простатспецифического мембранного антигена), — для терапии рака предстательной железы; линтузумаб, конъюгированный с висмутом-213 (^{213}Bi), актинием-225 (^{225}Ac) и торием-227 (^{227}Th), — для терапии ОМЛ.

В ходе клинических исследований были протестированы препараты: ^{213}Bi -ДОТАТОС — у пациентов с прогрессирующими нейроэндокринными опухолями, рефрактерными к β -излучению; ^{213}Bi -ДОТА-суб-

станция Р — для терапии пациентов с рецидивирующей глиобластомой; ^{177}Lu -меченный ПСМА-617 — в терапии метастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы; омбуртамаб — антитело против В7-Н3, которое после маркировки ^{131}I применялось у пациентов с нейробластомой.

Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) одобрило препараты: анти-CD20 антитела, меченные ^{90}Y (иттрием-90), ибри-тумаб тиуксетан (Zevalin[®]); анти-CD20 антитела, меченные ^{131}I (йодом-131), тозитумаб (Bexxar[®]); а также ^{177}Lu (лютеций-177) DOTATATE (Lutathera[®]). Zevalin[®] проявляет активность при рецидивирующей и/или рефрактерной CD20-позитивной индолентной В-клеточной неходжкинской лимфоме у взрослых пациентов и фолликулярной лимфоме [19]. Bexxar[®] одобрен для терапии CD20-положительной рецидивирующей или рефрактерной низкой степени злокачественности фолликулярной или трансформированной неходжкинских лимфом, которые прогрессировали во время или после терапии ритуксимабом, включая пациентов с неходжкинской лимфомой, рефрактерной к ритуксимабу [20]. Препарат Lutathera[®] эффективен при терапии положительных по рецептору соматостатина гастроэнтеропанкреатических нейроэндокринных опухолей [21].

К перспективным направлениям развития радиофармпрепаратов относят разработку препаратов на основе антагонистов рецепторов нейротензина. Выделяют 3 вида рецепторов нейротензина (NTSR1, NTSR2 и NTSR3). Нейротензин относится к семейству нейропептидов, взаимодействующих с соответствующими рецепторами. Нейротензиновые рецепторы экспрессируются в тканях колоректальной аденокарциномы, аденокарциномы поджелудочной железы. Взаимодействие нейротензина с NTSR1 стимулирует пролиферацию опухолевых клеток посредством различных сигнальных путей.

По этой причине антагонисты рецептора нейротензина могут рассматриваться в качестве потенциально эффективных противоопухолевых препаратов. Препарат ^{177}Lu -3BP-227, представляющий собой высокоаффинный непептидный антагонист NTSR1, применяли для терапии аденокарциномы поджелудочной железы [22, 23].

Реакции «трансплантат против хозяина», «трансплантат против опухоли», эффект «трансплантат против лейкоза»

К одному из главных осложнений алло-ТГСК относят РТПХ. Термин «РТПХ» отражает патологический процесс в организме реципиента после трансплантации иммунокомпетентных тканей, обусловленный иммунологической реакцией донорской ткани

против тканей реципиента. Попадание в организм реципиента зрелых Т-лимфоцитов из трансплантата может обуславливать развитие РТПХ. Эта реакция вызвана тем, что иммунная система донора содержит клоны Т-лимфоцитов, специфичные к аллоантигенам реципиента. При встрече донорских Т-лимфоцитов со своими антигенами происходит их активация с последующим системным повреждением здоровых тканей [24, 25].

К основным факторам риска развития РТПХ относятся: различия в HLA-совместимости донора и реципиента (при классическом подходе к профилактике РТПХ), донор женского пола у реципиента мужского пола, использование стволовых клеток периферической или пуповинной крови в качестве источника трансплантата, аллоиммунизация донора (беременность, гемотрансфузии в анамнезе), предшествующее лечение пациента моноклональными антителами, наличие цитомегаловирусной инфекции [26]. Профилактика РТПХ заключается в тщательном подборе донора, совместимого с реципиентом. Однако это не полностью предотвращает развитие РТПХ, так как помимо генов главного комплекса гистосовместимости донор и реципиент могут различаться по так называемым минорным антигенам гистосовместимости (МАГ) [24, 26].

Следует помнить о том, что иммунный ответ может возникать и при полностью HLA-совместимой алло-ТГСК, при которой мишенью иммунного ответа служат МАГ. МАГ представляют собой полиморфные пептиды, презентруемые в молекулах HLA, которые различаются по аминокислотной последовательности у донора и реципиента из-за генетических полиморфизмов вне HLA-локусов хромосомы 6. При алло-ТГСК иммунный ответ, направленный на МАГ, может приводить как к РТПХ, так и к реакции ТПО. Некоторые МАГ представляют собой перспективные и безопасные мишени для Т-клеточной иммунотерапии рецидива лейкоза после алло-ТГСК [27].

С целью уменьшения РТПХ может осуществляться предварительная подготовка трансплантата *ex vivo* и за счет воздействия на реципиента путем применения ряда препаратов. Подготовка трансплантата *ex vivo* может включать в себя деплецию Т-клеток трансплантата [28].

Кроме того, для деплеции/очистки гемопоэтических стволовых клеток при ОМЛ/МДС может применяться первое в своем классе анти-CD117 моноклональное антитело (JSP191) в качестве инновационной стратегии для уменьшения рецидивов при сохранении низкой токсичности НМАК. JSP191 действует путем ингибирования связывания фактора стволовых клеток с CD117 (c-Kit), присутствующим на гемопоэтических стволовых клетках. Как было показано на доклинических моделях, истоще-

ние пула гемопоэтических стволовых клеток может быть усилено сочетанием анти-CD117 МКА с низкой дозой тотального терапевтического облучения тела (ТТО).

На основании этих данных была инициирована I фаза испытания JSP191 у взрослых больных с МДС/ОМЛ высокого риска, которым предстоит алло-ТГСК с измеряемой МОБ (NCT04429191, ClinicalTrials.gov).

В клиническом исследовании анти-CD117 моноклональное антитело (JSP191) сочеталось с низкой дозой ТТО + флударабин. Ранние результаты I фазы исследования продемонстрировали, что режим JSP191/ТТО/флударабин безопасен, хорошо переносится и способен излечивать МОБ при МДС/ОМЛ у взрослых больных с НМАК перед алло-ТГСК [29].

Под Т-деплецией подразумевают обработку трансплантата с помощью МКА с целью удаления $\alpha\beta$ -Т-лимфоцитов. После Т-деплеции у больных онкогематологическими заболеваниями реже развивается РТПХ, но чаще возникают рецидивы, что может быть связано с уменьшением выраженности реакции ТПО, включая эффект «трансплантат против лейкоза» (ТПЛ) [30].

Идея использования эффекта ТПЛ для терапии и излечения от лейкоза с помощью аллогенной трансплантации костного мозга была высказана в 1956 г. после описания эффекта ТПЛ после трансплантации костного мозга по поводу лейкоза у мыши, что привело к возникновению концепции о том, что клетки донорского костного мозга могут быть ответственны за уничтожение лейкемии [31]. Это наблюдение было применено в клинике почти 10 лет спустя G. Mathé и соавт. – в 1965 г. [32].

Анализ результатов трансплантации, проведенный М.М. Horowitz и соавт., убедительно показал, что эффект ТПЛ важен для снижения вероятности рецидива. Повышенная частота рецидивов наблюдалась, когда трансплантат был истощен Т-клетками для предотвращения РТПХ [33]. В связи с этим представляется перспективной разработка направлений снижения риска РТПХ при сохранении или усилении эффекта ТПЛ. Кроме того, в центре внимания при проведении алло-ТГСК находятся $\gamma\delta$ -Т-лимфоциты [34].

Проведенные исследования показали, что у больных хроническим миелолейкозом с рецидивами после трансплантации костного мозга можно получить стабильную ремиссию в результате инфузии донорских лимфоцитов. Инфузия донорских лимфоцитов была успешно применена также для индукции ремиссии у больных с острым и хроническим лейкозом, лимфомой, множественной миеломой, МДС [35].

К настоящему времени установлено, что в некоторых случаях опухолевые метастазы инфильтрируются Т-клетками, и их регрессия может быть обусловлена этими лимфоцитами [36]. Исходя из этого,

предполагается, что аллогенные Т-лимфоциты способны так же воздействовать на опухоль.

Существование реакции ТПО подтверждает тот факт, что злокачественные новообразования, возникающие в органах и тканях, являющихся мишенями для РТПХ, имеют те же антигены, которые в равной степени подвергаются атаке цитотоксических лимфоцитов. Помимо этого, получены экспериментальные данные, подтверждающие существование реакции ТПО.

Применение инфузии донорских лимфоцитов для индукции реакции ТПО, вероятно, можно рассматривать как направление иммунотерапии онкологических заболеваний. Хотя в настоящее время к иммунотерапии (в классическом понимании) онкологических заболеваний относят применение вакцин, цитокинов, антител, адоптивной иммунотерапии и ингибиторов иммунных контрольных точек.

Для лечения хронической РТПХ используются ингибиторы кальциневрина (циклоспорин А или такролимус) в комбинации с глюкокортикоидами. Возможно сочетание этих препаратов с антитимоцитарным/антилимфоцитарным иммуноглобулином, микофенолата мофетилем. В настоящее время одним из основных методов терапии при хронической РТПХ является фотохимиотерапия (экстракорпоральный фотоферез) — экстракорпоральное воздействие на кровь реципиента ультрафиолетовым излучением после предварительного приема препаратов, обладающих фотосенсибилизирующим эффектом (псорален).

Механизм действия экстракорпорального облучения крови до конца не ясен. Считают, что он может быть связан с индукцией апоптоза цитотоксических Т-лимфоцитов и созданием толерантности при развитии Т-клеточного ответа [37, 38]. Перспективным подходом к лечению и профилактике РТПХ является использование мезенхимальных стволовых клеток при алло-ТГСК. Однако, несмотря на большое количество проведенных клинических исследований эффективности использования мезенхимальных стволовых клеток, в настоящее время нет однозначных рекомендаций, регламентирующих их применение, а результаты различных испытаний весьма противоречивы. Толерогенные свойства мезенхимальных стволовых клеток при регуляции иммунного ответа опосредованы прежде всего спектром секретируемых биорегуляторов, которые подавляют активацию и пролиферацию эффекторных иммунных клеток [39, 40].

Заключение

Таким образом, алло-ТГСК в различных модификациях имеет большое значение в лечении онкологических (онкогематологических) заболеваний, включая опухоли кроветворной ткани. Однако остается еще много вопросов, требующих своего решения, поэтому необходима дальнейшая оптимизация подходов к трансплантации за счет снижения риска рецидива заболевания и минимизации осложнений, связанных с трансплантацией.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Валиев Т.Т., Шервашидзе М.А., Осипова И.В. и др. Протокол ALL-IC BFM 2002: результаты лечения острого лимфобластного лейкоза у детей в рамках многоцентрового клинического исследования. Клиническая онкогематология 2022;15(2):119–29. DOI: 10.21320/2500-2139-2022-15-2-119-129
Valiev T.T., Shervashidze M.A., Osipova I.V. et al. Protocol ALL-IC BFM 2002: outcomes of pediatric acute lymphoblastic leukemia treatment under multi-center clinical trial. Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology 2022;15(2):119–29. (In Russ.). DOI: 10.21320/2500-2139-2022-15-2-119-129
2. Snowden J.A., Sánchez-Ortega I., Corbacioglu S. et al. Indications for haematopoietic cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2022. Bone Marrow Transplant 2022;57(8):1217–39. DOI: 10.1038/s41409-022-01691-w
3. de Witte T., Oosterveld M., Muus P. Autologous and allogeneic stem cell transplantation for myelodysplastic syndrome. Blood Rev 2007;21(1):49–59. DOI: 10.1016/j.blre.2006.03.002
4. Doubek M., Folber F., Koristek Z. et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in adult acute lymphoblastic leukemia: still not out of fashion. Ann Hematol 2009;88(9):881–7. DOI: 10.1007/s00277-009-0700-3
5. Liu X., Wu M., Peng Y. et al. Improvement in poor graft function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation upon administration of mesenchymal stem cells from third-party donors: a pilot prospective study. Cell Transplant 2014;23(9):1087–98. DOI: 10.3727/096368912X661319
6. EBMT annual report 2020. The EBMT Registry 2020. Available at: <https://www.ebmt.org/annual-report-2020/ebmt-registry-2020>
7. Shimomura Y., Hara M., Konuma T. et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelodysplastic syndrome in adolescent and young adult patients. Bone Marrow Transplant 2021;56(10):2510–17. DOI: 10.1038/s41409-021-01324-8
8. Truong T.H., Jinca C., Mann G. et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for children with acute lymphoblastic leukemia: shifting indications in the era of immunotherapy. Front Pediatr 2021;9:782785. DOI: 10.3389/fped.2021.782785
9. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Myelodysplastic Syndromes. Version 1.2023. Available at: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/mds.pdf
10. Suciú S., Mandelli F., de Witte T. et al. Allogeneic compared with autologous stem cell transplantation in the treatment of patients younger than 46 years with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR1): an intention-to-treat analysis of the EORTC/GIMEMAAML-10 trial. Blood 2003;102(4):1232–40. DOI: 10.1182/blood-2002-12-3714
11. Röllig C., Bornhäuser M., Thiede C. et al. Long-term prognosis of acute myeloid leukemia according to the new genetic risk

- classification of the European LeukemiaNet recommendations: evaluation of the proposed reporting system. *J Clin Oncol* 2011;29(20):2758–65. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.8500
12. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Acute Myeloid Leukemia. Version 2.2022. Available at: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/aml.pdf
 13. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Acute Lymphoblastic Leukemia. Version 1.2022. Available at: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/all.pdf
 14. Шервашидзе М.А., Валиев Т.Т. Совершенствование программ терапии острого лимфобластного лейкоза у детей: акцент на минимальную остаточную болезнь. *Онкогематология* 2020;15(3):12–26. DOI: 10.17650/1818-8346-2020-15-2-19-28
Shervashidze M.A., Valiev T.T. Pediatric acute lymphoblastic leukemia treatment protocols improvement: emphasis on minimal residual disease. *Onkohematologiya = Oncohematology* 2020;15(3):12–26. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2020-15-2-19-28
 15. Juric M.K., Ghimire S., Ogonek J. et al. Milestones of hematopoietic stem cell transplantation – from first human studies to current developments. *Front Immunol* 2016;7:470. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00470
 16. Мелкова К.Н., Петрова Г.Д., Горбунова Н.В. и др. Классификация режимов кондиционирования: исторические предпосылки и современные представления. *Клиническая онкогематология* 2017;10(4):494–500. DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-4-494-500
Melkova K.N., Petrova G.D., Gorbunova N.V. et al. Classification of conditioning regimens for bone marrow transplantation: historical background and current perspectives. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2017;10(4):494–500. (In Russ.). DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-4-494-500
 17. Larson S., Carrasquillo J., Cheung N.K., Press O.W. Radioimmunotherapy of human tumours. *Nat Rev Cancer* 2015;15(6):347–60. DOI: 10.1038/nrc3925
 18. Bertagnolli M.M. Radioimmunotherapy for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(13):4637–8. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-05-0485
 19. Cheung M.C., Haynes A.E., Stevens A. et al. Yttrium 90 ibritumomab tiuxetan in lymphoma. *Leuk Lymph* 2006;47(6):967–7. DOI: 10.1080/10428190600572582
 20. Davies A.J., Rohatiner A.Z.S., Howell S. et al. Tositumomab and iodine I¹³¹ tositumomab for recurrent indolent and transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2004;22(8):1469–79. DOI: 10.1200/JCO.2004.06.055
 21. Kwekkeboom D.J., de Herder W.W., Krenning E.P. Somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy in patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2011;40(1):173–85. DOI: 10.1016/j.ecl.2010.12.003
 22. Schulz J., Rohracker M., Stiebler M. et al. Proof of therapeutic efficacy of a ¹⁷⁷Lu-labeled neurotensin receptor 1 antagonist in a colon carcinoma xenograft model. *J Nucl Med* 2017;58(6):936–41. DOI: 10.2967/jnumed.116.185140
 23. Baum R.P., Singh A., Schuchardt C. et al. ¹⁷⁷Lu-3BP-227 for neurotensin receptor 1-targeted therapy of metastatic pancreatic adenocarcinoma: first clinical results. *J Nucl Med* 2018;59(5):809–14. DOI: 10.2967/jnumed.117.193847
 24. Ghimire S., Weber D., Mavin E. et al. Pathophysiology of GvHD and other HSCT-related major complications. *Front Immunol* 2017;8:79. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00079
 25. Алиев Т.З., Мачнева Е.Б., Сидорова Н.В. и др. Поражение кожных покровов при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Обзор литературы. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2020;19(2):184–92. DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-2-184-192
Aliev T.Z., Machneva E.B., Sidorova N.V. et al. Skin damage after the hematopoietic stem cell transplantation. Literature review. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii = Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2020; 19(2):184–92. (In Russ.). DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-2-184-192
 26. Реакция «трансплантат против хозяина». Доступно по: <https://medobr.com/news/reaktsiya-transplantat-protiv-khozyaina/>.
“Graft versus host” reaction. (In Russ.). Available at: <https://medobr.com/news/reaktsiya-transplantat-protiv-khozyaina/>.
 27. Goulmy E. Minor histocompatibility antigens: allo target molecules for tumor-specific immunotherapy. *Cancer J* 2004; 10(1):1–7. DOI: 10.1097/00130404-200401000-00001
 28. Choi E.S., Im H.J., Kim H. et al. Depletion of αβ⁺ T cells for a haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in children. *J Clin Apher* 2018;33(4):521–8. DOI: 10.1002/jca.21634
 29. Muffly L.S., Chin M., Kwon H.-S. et al. Early results of phase 1 study of JSP191, an anti-CD117 monoclonal antibody, with non-meloablative conditioning in older adults with MRD-positive MDS/AML undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2021;39(15_suppl):7035. DOI: 10.1200/jco.2021.39.15_suppl.7035
 30. Schmaltz C. Graft versus leukemia and graft versus tumor activity. In: *Encyclopedia of Cancer*. Ed. by J.R. Bertino. 2nd edn. San Diego, Elsevier, 2002. P. 325–338. DOI: 10.1016/B0-12-227555-1/00094-0
 31. Barnes D.W., Corp M.J., Loutit J.F., Neal F.E. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J* 1956;2(4993):626–7. DOI: 10.1136/bmj.2.4993.626
 32. Mathé G., Amiel J.L., Schwarzenberg L. et al. Successful allogeneic bone marrow transplantation in man: chimerism, induced specific tolerance and possible anti-leukemic effects. *Blood* 1965;25(2):179–96. DOI: 10.1182/blood.v25.2.179.179
 33. Dickinson A.M., Norden J., Li S. et al. Graft-versus-leukemia effect following hematopoietic stem cell transplantation for leukemia. *Front Immunol* 2017;8:496. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00496
 34. Minculescu L., Sengeløv H. The role of gamma delta T cells in haematopoietic stem cell transplantation. *Scand J Immunol* 2015;81(6):459–68. DOI: 10.1111/sji.12289
 35. Слесарчук О.А., Бабенко Е.В., Семенова Е.В. и др. Эффективность инфузии донорских лимфоцитов у пациентов после различных видов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. *Терапевтический архив* 2013; 85(7):26–33.
Slesarchuk O.A., Babenko E.V., Semenova E.V. et al. Efficacy of donor lymphocyte infusion in patients after different types of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive* 2013;85(7):26–33. (In Russ.).
 36. Vose B.M., Moore M. Suppressor cell activity of lymphocytes infiltrating human lung and breast tumours. *Int J Cancer* 1979;24(5):579–85. DOI: 10.1002/ijc.2910240510
 37. Гуз И.В., Трахтман П.Е. Экстракорпоральный фотоферез в лечении реакции «трансплантат против хозяина». *Онкогематология* 2016;11(1):47–51. DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-1-47-51
Guz I.V., Trachtman P.E. Extracorporeal photopheresis in the treatment of graft-versus-host disease. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2016;11(1):47–51. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-1-47-51
 38. Bruserud Ø., Tvedt T.H.A., Paulsen P.Q. et al. Extracorporeal photopheresis (photochemotherapy) in the treatment of acute and chronic graft versus host disease: immunological mechanisms and the results from clinical studies. *Cancer Immunol Immunother* 2014;63(8):757–77. DOI: 10.1007/s00262-014-1578-z

39. Kiselevskiy M., Vlasenko R., Reshetnikova V. et al. Potential use of mesenchymal multipotent cells for hemopoietic stem cell transplantation: pro and contra. *J Pediatr Hematol Oncol* 2021;43(3):90–4. DOI: 10.1097/MPH.0000000000002065
40. Киселевский М.В., Власенко Р.Я., Степанян Н.Г. и др. Секретом мезенхимных стволовых клеток костного мозга: иммуносупрессивный или провоспалительный? *Клеточные технологии в биологии и медицине* 2021;3:171–5. DOI: 10.47056/1814-3490-2021-3-171-175
- Kiselevsky M.V., Vlasenko R.Ya., Stepanyan N.G. et al. Mesenchymal bone marrow stem cell secretion: is it immunosuppressive or pro-inflammatory? *Kletochniye tekhnologii v biologii i medicine = Cell Technologies in Biology and Medicine* 2021;3:171–5. (In Russ.). DOI: 10.47056/1814-3490-2021-3-171-175

Вклад авторов

А.Д. Ширин: разработка концепции и дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;

О.Ю. Баранова: обзор публикаций по теме статьи, редактирование статьи;

В.В. Решетникова: написание и редактирование текста статьи.

Author's contributions

A.D. Shirin: research concept and design, review of publications on the topic of the article, article writing;

O.Yu. Baranova: review of publications on the topic of the article, editing of the article;

V.V. Reshetnikova: writing and editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.Д. Ширин / A.D. Shirin: <https://orcid.org/0000-0003-3244-7774>

О.Ю. Баранова / O.Yu. Baranova: <https://orcid.org/0000-0002-0202-8176>

В.В. Решетникова / V.V. Reshetnikova: <https://orcid.org/0000-0002-2821-3425>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 28.10.2022. Принята к публикации: 13.02.2023.

Article received: 28.10.2022. Accepted for publication: 13.02.2023.

Клиническая значимость обнаружения микрометастазов в лимфатических узлах при раке яичников

Ю. В. Алдушкина¹, Н. Ю. Анисимова^{2,3}, А. Н. Грицай¹, К. М. Новрузов², Ю. И. Должикова²,
О. А. Одарюк⁴, Д. В. Филоненко⁵

¹Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 105425 Москва, 3-я Парковая ул., 51, стр. 1;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

³ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»; Россия, 119049 Москва, Ленинский пр-кт, 4;

⁴ГБУЗ «Городская поликлиника №8 Департамента здравоохранения города Москвы»; Россия, 119602 Москва, Мичуринский пр-кт, 16;

⁵ГБУЗ «Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы»; Россия, 111123 Москва, шоссе Энтузиастов, 86, стр. 6.

Контакты: Юлия Владимировна Алдушкина juliaald@mail.ru

Рак яичников является самой частой разновидностью онкологического процесса в этом органе и характеризуется высокой вероятностью летального исхода. Считается, что это обусловлено недостаточно эффективной диагностикой распространенности и тяжести указанного заболевания. В настоящем обзоре приведены данные о развитии рецидива заболевания у значимого числа пациентов после циторедуктивного хирургического вмешательства. По мнению ряда авторов, причиной высокого риска рецидива является недостаточная информативность метода изучения гистологических препаратов регионарных лимфатических узлов после окраски гематоксилином и эозином для выявления метастазов небольшого объема, включая изолированные опухолевые клетки и микрометастазы. Для повышения точности такой диагностики рекомендовано дополнить изучение многоуровневых срезов лимфатических узлов с использованием рутинного окрашивания применением иммуногистохимии и других методов с использованием различных антител к цитокератинам наряду с другими эпителиальными маркерами. В обзоре приводится анализ мнений различных исследователей о прогностической значимости обнаружения микрометастазов в лимфатических узлах, что может повысить эффективность терапии за счет более точной оценки распространенности заболевания и коррекции тактики лечения пациентов с различными онкологическими заболеваниями.

Ключевые слова: рак яичников, микрометастазы, лимфатический узел, опухолевые клетки, цитокератин

Для цитирования: Алдушкина Ю. В., Анисимова Н. Ю., Грицай А. Н. и др. Клиническая значимость обнаружения микрометастазов в лимфатических узлах при раке яичников. Российский биотерапевтический журнал 2023; 22(2):20–6. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-2-20-26

Clinical significance of detection of micrometastases in lymph nodes in ovarian cancer

Yulia Yu. Aldushkina¹, Natalia Yu. Anisimova^{2,3}, Anatolii N. Gritsai¹, Keryam M. Novruzov², Yulia I. Dolzhikova²,
Oksana A. Odaryuk⁴, Dmitry V. Filonenko⁵

¹N.A. Lopatkin Scientific Research Institute of Urology and Interventional Radiology – branch of the National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 51 3rd Parkovaya St., Moscow 105425, Russia;

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

³National University of Science and Technology “MISIS”; 4 Leninskiy Ave., 119049 Moscow, Russia;

⁴City Polyclinic No. 8, Moscow Healthcare Department; 16 Michurinskiy Prospect, 119602 Moscow, Russia;

⁵A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow Healthcare Department; Bld. 6, 86 Shosse Entuziastov, 111123 Moscow, Russia

Contacts: Yulia Vladimirovna Aldushkina juliaald@mail.ru

Ovarian cancer of epithelial origin is the most common type of oncological process in this organ and is characterized by a high probability of fatal outcome. It is believed that this is due to insufficiently effective diagnosis of the prevalence and severity of this disease. This review presents data on the development of disease recurrence in a significant number of patients after cytoreductive surgery. According to some authors, the reason for the high risk of recurrence is the insufficient information content of the method of studying histological preparations of regional lymph nodes after staining with hematoxylin and eosin to detect small-sized metastases, including isolated tumor cells and micrometastases. To improve the accuracy of such diagnostics, it is recommended to supplement the study of multilevel sections of lymph nodes using routine staining with the use of immunohistochemistry and other methods using various antibodies to cytokeratins, along with other epithelial markers. The review provides an analysis of the opinions of various researchers on the prognostic significance of the detection of micrometastases in the lymph nodes, which can increase the effectiveness of therapy due to a more accurate assessment of the prevalence of the disease and correction of the tactics of treating patients with various oncological diseases.

Key words: ovarian cancer, micrometastases, lymph node, tumor cells, cytokeratin

For citation: Aldushkina Yu.V., Anisimova N.Yu., Gritsai A.N. et al. Clinical significance of detection of micrometastases in lymph nodes in ovarian cancer. *Rossiyskiy bioterapevicheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2023;22(2):20–6. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-2-20-26

Рак яичников (РЯ) — одно из наиболее распространенных и неблагоприятно протекающих опухолевых заболеваний. За последнее десятилетие практически во всех странах отмечается тенденция к росту показателей заболеваемости наряду с незначительным снижением смертности и 5-летней выживаемости [1].

Рак яичников составляет до 90 % выявленных случаев опухолей этого органа [2]. При этом РЯ характеризуется самой высокой летальностью в сравнении с другими онкологическими заболеваниями женской репродуктивной системы [3], поскольку его чаще выявляют на поздних стадиях развития заболевания.

К злокачественным опухолям яичников относят следующие гистологические типы: серозный, светлоклеточный, муцинозный, эндометриоидный, серомуцинозный типы, опухоль Бреннера, недифференцированная карцинома и их подтипы [4]. Серозная аденокарцинома является наиболее часто встречающимся подтипом, который обнаруживают в 68–71 % случаях РЯ [5]. В сравнении с этим подтипом светлоклеточный рак (СР) встречается не так часто, выявляется на более ранней стадии, чем серозная карцинома, а также имеет тенденцию реже метастазировать в тазовые лимфатические узлы, однако характеризуется худшим прогнозом [6–8]. Так, в исследовании F.C. Ku и соавт. при сравнении результатов в группах пациентов со СР и серозной карциномой было показано, что 5-летняя выживаемость значительно ниже у пациентов первой группы, несмотря на высокий процент выявления этого заболевания на I стадии [9]. Кроме того, 32,8 % пациентов с рецидивирующим или персистирующим СР имели I стадию заболевания на момент постановки диагноза [10].

Было отмечено возникновение рецидива заболевания у значительного числа пациентов, характеризующихся отсутствием выявленных метастазов в лимфатических узлах, несмотря на проведенное в полном объеме циторедуктивное хирургическое вмешательство. На основании проведенного анализа полученных данных авторами было сформулировано предположение, что причиной высокого риска рецидива является недостаточность рутинного изучения гистологических препаратов регионарных лимфатических узлов после окраски гематоксилином и эозином для выявления метастазов небольшого объема, включая изолированные опухолевые клетки (ИОК) и микрометастазы.

Концепцию микрометастазов впервые сформулировали в 1940–1950-х годах, когда было опубликовано много сообщений о выявлении опухолевых клеток в крови и костном мозге онкологических больных без видимых метастазов. ИОК в регионарных лимфатических узлах определяются как одиночные опухолевые клетки или кластеры клеток диаметром 0,2 мм [11]. В обозначении стадии онкологического заболевания использование символа «i» в скобках после pN0 означает, что метастазы в лимфатических узлах отсутствуют, но при углубленном морфологическом исследовании в них могут быть обнаружены ИОК. При этом обозначение pN0 (i–) указывает на отсутствие в лимфатических узлах как метастазов, так и выявленных ИОК. pN0 (i+) означает, что ИОК были обнаружены при морфологическом исследовании. Микрометастазы определяются как метастазы размером более 0,2 мм, но менее 2,0 мм.

В течение последних двух десятилетий использовались различные методы для выявления узловых

микрометастазов и ИОК. В частности, с этой целью было предложено использовать множественные срезы лимфатических узлов с поэтапным разделением парафиновых блоков, а в качестве вспомогательных методов применять иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание эпителиальных и/или ассоциированных с опухолью антигенов, таких как цитокератин, раково-эмбриональный антиген, САМ 5.2 [12, 13]. В последние годы были внедрены более сложные методы молекулярной диагностики для улучшения выявления микрометастазов в региональных лимфатических узлах [14, 15]. Однако следует учитывать, что вследствие высокой стоимости используемых средств и оборудования, а также необходимости привлечения специалистов высокой квалификации эти методы имеют очень ограниченное применение в рутинной повседневной практике клинических центров с ограниченными ресурсами.

В работе Y. Ohta и соавт. было отмечено, что, несмотря на то что ИОК исходно могут не выявляться при окрашивании гематоксилином и эозином, узловые метастазы размером 2,0 мм, включая как ИОК, так и микрометастазы, потенциально могут быть идентифицированы с помощью ИГХ-метода с использованием антител против цитокератина. В частности, данный способ был предложен авторами с целью выявления цитокератина [16]. Другими исследователями было предложено использовать антитела к панцитокератину (АЕ1/АЕ3), распознающие цитокератины подсемейств А и В, для идентификации ороговевающих неопластических клеток эпителиального происхождения в образцах, полученных в результате лимфаденэктомии [17]. Авторы вышеупомянутого исследования ставили цель определить, может ли применение ИГХ-метода с использованием антител против панцитокератина увеличить вероятность выявления ИОК и микрометастазов в тазовых лимфатических узлах у пациентов с I стадией СР, перенесших первичное хирургическое вмешательство, в сравнении с эффективностью использования стандартного окрашивания срезов лимфатических узлов гематоксилином и эозином, а также оценить вероятность развития рецидива СР.

Для проведения ретроспективного исследования Y.-C. Wang и соавт. были изучены образцы тазовых лимфатических узлов 197 пациентов со СР I стадии, перенесших хирургическое лечение [2]. Анализ гистологических препаратов лимфатических узлов, окрашенных гематоксилином и эозином, не позволил выявить признаки метастазов у всех пациентов, включенных в исследование. Анализ полученных Y.-C. Wang и соавт. результатов позволил резюмировать, что, во-первых, ИОК и микрометастазы в тазовых лимфатических узлах у пациентов со СР встречаются редко. Этот вывод был сделан, поскольку опухолевые

панцитокератинположительные кластеры были выявлены только у 5 из 197 пациентов, участвовавших в исследовании (ИОК – 3 пациента, микрометастазы – 2 пациента). Во-вторых, применение ИГХ-метода с антителами против панцитокератинов увеличило вероятность обнаружения ИОК и микрометастазов по сравнению с обычным окрашиванием гематоксилином и эозином. В указанном исследовании не удалось подтвердить прогностическое значение обнаружения ИОК и микрометастазов в отношении рецидивов СР. Авторами было высказано предположение, что ИГХ-исследование с использованием антител против панцитокератинов может выявлять узловые очаги эндосальпингиоза, которые неопытные патологоанатомы могут ошибочно интерпретировать как метастатическую карциному.

К настоящему времени не накоплено достаточно данных о частоте и клинической значимости узловых метастазов размером <2,0 мм (ИОК и микрометастазы) у пациенток с ранней стадией РЯ. Согласно данным M. Suzuki и соавт. в 4 из 8 случаев СР стадии I/II (50 %) при использовании ИГХ-исследования с антителами к p53 были выявлены микрометастазы, частота обнаружения которых заметно отличалась от наблюдаемой в вышеописанном исследовании (2,53 %) [18]. Стоит отметить, что целью этого исследования была попытка определить, обусловлено ли обнаруженное несоответствие различием профессионального уровня патологоанатомов. Данное предположение было опровергнуто авторами, поскольку во всех случаях все метастатические очаги, обнаруженные при окрашивании гематоксилином и эозином, были подтверждены при проведении ИГХ-исследования с использованием антител против панцитокератина. Известно, что этот методический подход был успешно использован и для обнаружения метастазов при раке желудка [19–21], немелкоклеточном раке легкого [22] и раке шейки матки [23]. Ряд исследователей сообщали, что у пациентов со злокачественными новообразованиями шейки матки микрометастазы в тазовых лимфатических узлах могут быть признаками лимфоваскулярной инвазии. Систематический обзор накопленной по данному вопросу информации позволил его авторам констатировать, что прогностическая ценность и клинические последствия обнаружения ИОК и микрометастазов при раке шейки матки все еще не сформулированы достаточно четко [24]. Неопределенное значение этих клинических признаков может приводить к завышению значимости наличия микрометастазов в лимфатических узлах. Система стадирования, разработанная Американским объединенным комитетом по раку (American Joint Committee on Cancer, AJCC), учитывает наличие микрометастазов при некоторых гинекологических злокачественных

новообразованиях, включая карциному шейки матки, эндометрия, яичников и вульвы [25]. А система стадирования Международной федерации по гинекологии и акушерству (FIGO, 2014) признает важность определения размера метастазов для уточнения стадии заболевания: П1А1(i) – при наличии метастатических очагов 10 мм и П1А1(ii) – при наличии метастатических очагов >10 мм.

В упомянутом выше исследовании Y.-C. Wang и соавт. отмечено, что у части пациентов со СР (2,53 %) первоначально метастазы в лимфатических узлах выявлены не были, однако при углубленном гистологическом исследовании были обнаружены скрытые метастазы размером <2,0 мм [2]. Авторами было высказано мнение, что прогностическая значимость обнаружения в лимфатических узлах метастазов размерами >2,0 мм на данный момент определена в первую очередь потому, что благодаря размерам их легче обнаружить на гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, и, следовательно, учесть при проведении статистического анализа, тогда как возможность повышения эффективности выявления ИОК и микрометастазов наряду с определением их прогностического значения еще предстоит исследовать. Для обнаружения скрытых ИОК и/или микрометастазов в лимфатических узлах пациентов со СР авторами был использован ИГХ-метод с антителами против панцитокератина. Однако следует учесть, что этот протокол использовался в исследовательских целях и обычно не рекомендуется для клинической оценки состава узлов, полученных при тазовой лимфаденэктомии. Другой важной находкой указанного исследования явилась возможность обнаружения методом ИГХ-исследования с антителами против панцитокератина очагов эндосальпингоза, представляющих собой доброкачественные мюллеровы включения, которые встречаются примерно у 1/5 всех пациентов с гинекологическими злокачественными новообразованиями. Однако при рассмотрении возможностей рутинного применения антител к панцитокератинам для обнаружения ИОК и/или микрометастазов следует учитывать возможность сходства результатов теста с метастатической карциномой. В целом было показано, что при анализе относительно большой группы пациентов с I стадией СР ИОК и микрометастазы в тазовых узлах выявляли достаточно редко. Вероятность их обнаружения повышалась при применении ИГХ-исследования с антителами против панцитокератина в дополнение к анализу с использованием окраски гематоксилином и эозином. Что касается осознания роли обнаружения микрометастазов в прогнозировании рецидива СР и определении тактики лечения этого заболевания, то эти вопросы требуют дальнейшего изучения.

Как уже упоминалось выше, наличие микрометастазов в лимфатических узлах может иметь важное прогностическое значение и при других локализациях. В частности, анализ результатов исследования пациентов с опухолями молочной железы, проведенный M. de Boer и соавт., показал, что обнаружение ИОК и микрометастазов в регионарных лимфатических узлах коррелировало со снижением выживаемости без прогрессирования у пациентов с начальной стадией заболевания [26]. Более того, скрытые метастазы в лимфатические узлы могут быть связаны со снижением выживаемости и уменьшением безрецидивного периода [27]. Однако в настоящее время пациентам с ранней стадией рака молочной железы часто не проводят диссекцию подмышечных лимфатических узлов, что не позволяет оценить наличие в них микрометастазов.

Известно, что у больных колоректальным раком II стадии вероятность рецидива составляет 20–30 %, при этом предполагается, что в лимфатических узлах у таких пациентов могут быть микрометастазы, которые не выявляются при обычном гистопатологическом исследовании [28]. Y.P. Wong и соавт. была проведена оценка эффективности применения многоуровневого гистологического исследования при окрашивании гематоксилином и эозином и ИГХ-метода с использованием цитокератина AE1/AE3 для выявления микрометастазов в гистологически отрицательных лимфатических узлах при рутинной оценке. Были рассмотрены 62 случая I и II стадии заболевания с исследованием 635 лимфатических узлов. У 2 пациентов обнаружены микрометастазы, выявленные обоими методами (3,2 % от общего количества пациентов). С помощью цитокератина AE1/AE3 дополнительно идентифицировали 4 пациентов с одиночными опухолевыми клетками в лимфатических узлах (6,5 % от общего количества пациентов). Обнаруженные в лимфатических узлах микрометастазы не были связаны с размерами опухоли, глубиной инвазии, степенью злокачественности опухоли, рецидивом заболевания или отдаленным метастазированием. По заключению авторов исследования, для обнаружения узловых микрометастазов нет различий в эффективности обоих использованных методов [28]. Следует отметить, что сделанные авторами выводы согласуются с результатами других исследований [20, 29]. По результатам проведенного анализа M.D. Linden и R.J. Zarbo смогли выявить 2 пациентов, у которых были обнаружены признаки распространенности процесса как с помощью многоуровневых срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, так и с помощью ИГХ-методов, что составило 3,2 % от общего числа обследованных больных [30]. Выявленное этими исследователями число пациентов группы риска меньше, чем отмеченное

в работах других авторов (20–30 %) [31, 32]. Это согласуется с информацией M.S. Natrah и соавт. о том, что почти 90 % случаев колоректального рака проявляются поздно: 42 % на стадии III, 47 % – на стадии IV [33]. Таким образом, в исследовании M. D. Linden и R.J. Zarbo была низкой доля пациентов с ранней стадией заболевания (I и II) в общем числе больных, отобранных для исследования [30]. Также следует отметить, что авторам не удалось подтвердить корреляцию наличия микрометастазов в лимфатических узлах с различными клинико-патологическими параметрами, имеющими прогностическое значение: количество лимфатических узлов, степень опухоли, глубина инвазии и стадия опухоли. Отметим, что полученный результат следует интерпретировать с осторожностью из-за небольшого размера выборки и исключения из исследования пациентов с более высокой степенью тяжести заболевания, которые обычно имеют метастазы в лимфатических узлах при обращении в медицинские учреждения.

Несомненно то, что роль патологоанатомов в точном выявлении метастазов в удаленных лимфатических узлах во время исследования имеет важное клиническое значение. Согласно рекомендациям AJCC и Коллегии американских патологоанатомов (College of American Pathologists, CAP) следует изучить не менее 12 лимфатических узлов, чтобы точно определить стадию заболевания, что имеет прогностическое значение для эффективности лечения [34]. Наличие микрометастазов в лимфатических узлах рассматривается как свидетельство прогрессирования заболевания. В частности, согласно руководству AJCC по стадированию рака выявление этого признака подразумевает наличие III стадии заболевания, а также ухудшение прогноза его исхода из-за распространенности заболевания РЯ [35]. Протокол лечения пациентов с III стадией заболевания включает адъювантную химиотерапию в дополнение к радикальному хирургическому удалению опухоли [36]. Следовательно, необходимо найти достаточно надежный и в то же время недорогой метод, доступный для применения в лечебных учреждениях, который поможет выявлению пациентов с микрометастазами в лимфатических узлах. Для этой цели также было рекомендовано использовать различные антитела к цитокератинам, в частности к AE1/AE3. Другие эпителиальные маркеры, например эпителиальный маркерный антиген (EMA) и САМ 5.2, обладают недостаточной специфичностью, поскольку кроме опухолевых клеток они также могут окрашивать макрофаги в лимфатических узлах [30].

Клиническое значение микрометастазов в лимфатических узлах подробно обсуждалось в исследованиях при различных онкологических заболеваниях (рак молочной железы, немелкоклеточный рак легкого и рак пищевода) [37, 38]. К сожалению, опубликованные данные показали противоречивые результаты.

Так, D. Iddings и соавт. в метаанализе 9 исследований, основанных на изучении данных 608 человек, отмечали, что пациенты с обнаруженными с помощью ИГХ-исследования микрометастазами в лимфатических узлах имели более короткую 3-летнюю безрецидивную выживаемость, что, однако, не было подтверждено статистическим анализом [39]. Другими исследователями была показана взаимосвязь обнаружения микрометастазов, выявленных с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, с отрицательным клиническим исходом, тогда как эффективность применения многоуровневых срезов и ИГХ-метода с этой целью была низкой [14, 15, 40]. Причина, по которой ИГХ-идентификация микрометастазов не продемонстрировала свою прогностическую значимость, осталась невыясненной. По версии некоторых исследователей, это может быть связано с отсутствием четких критериев, позволяющих характеризовать лимфатический узел как положительный относительно присутствия в нем ИОК или метастазов. Обзор данных литературы показал, что ни одно из известных проведенных исследований не представило однозначных данных, чтобы сделать окончательный вывод о клинической значимости ИГХ-метода диагностики [41]. Авторы предположили, что для определения того, является ли скрытое метастазирование в лимфатические узлы прогностическим признаком худшего исхода, необходимо дополнительно провести адекватно и тщательно спланированное исследование с большим количеством пациентов, предусматривающее анализ достаточного количества собранных лимфатических узлов (минимум 12) с использованием спектра сложных молекулярно-генетических методов для их изучения. Кроме того, для увеличения шансов обнаружения микрометастазов или ИОК предложено увеличить количество срезов лимфатического узла размером >10 мм [42].

Таким образом, приведенный анализ данных литературы позволяет заключить, что изучение многоуровневых срезов лимфатических узлов пациентов с различными солидными опухолями с использованием рутинного окрашивания гематоксилином и эозином, а также применение ИГХ-исследования с использованием эпителиальных маркеров цитокератинов могут рассматриваться как ограниченно информативные методы при использовании по отдельности и достаточно эффективные – при совместном применении. Однако ряд авторов высказывают предположение, что для доказательства прогностической значимости обнаружения микрометастазов в лимфатических узлах онкологических больных необходимо проведение дополнительных исследований с использованием различных методических

и аналитических подходов [35, 39, 41]. Вместе с тем следует отметить, что определение прогностической значимости обнаружения микрометастазов и ИОК в лимфатических узлах имеет важное клиническое

значение и может повысить эффективность терапии онкологических больных за счет адекватной оценки распространенности заболевания и коррекции тактики лечения [43].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- IARC, WHO. Ovary. Cancer Over Time, Dec. 2020. Available at: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/25-Ovary-fact-sheet.pdf>. Accessed 14 Dec, 2022.
- Wang Y.-Ch., Wu R.-Ch., Jung Sh.-M. et al. Detection and prognostic significance of isolated tumor cells and micrometastases in pelvic lymph nodes of patients with early ovarian clear cell carcinoma. *J Formos Med Assoc* 2021;120(10):1869–75. DOI: 10.1016/j.jfma.2021.03.028
- Солопова А.Е., Чашин А.А., Солопова А.Г., Макацария А.Д. Современные взгляды на патогенез и возможности диагностики эпителиального рака яичников. *Акушерство, гинекология и репродукция* 2016;10(1):75–83. DOI: 10.17749/2313-7347.2015.10.1.075-083
Solopova A.E., Chashchin A.A., Solopova A.G., Makatsariya A.D. Current opinions concerning the pathogenesis of epithelial ovarian cancer and new diagnostic approaches to the disease. *Akusherstvo, ginekologiya i reproduksia = Obstetrics, Gynecology and Reproduction* 2016;10(1):75–83. (In Russ.). DOI: 10.17749/2313-7347.2015.10.1.075-083
- Vaughan S., Coward J.I., Bast R.C. Jr. et al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer* 2011;11(10):719–25. DOI: 10.1038/nrc3144
- Wright P.K., McVey R.J., Wilkinson N. Specimen cut-up. In: *Pathology of the ovary, fallopian tube and peritoneum. Essentials of diagnostic gynecological pathology*. Ed. by N. Wilkinson. Springer, London, 2014. P. 481–496. DOI: 10.1007/978-1-4471-2942-4_20
- Del Carmen M.G., Birrer M., Schorge J.O. Clear cell carcinoma of the ovary: a review of the literature. *Gynecol Oncol* 2012;126(3):481–90. DOI: 10.1016/j.ygyno.2012.04.021
- Chan J.K., Teoh D., Hu J.M. et al. Do clear cell ovarian carcinomas have poorer prognosis compared to other epithelial cell types? A study of 1411 clear cell ovarian cancers. *Gynecol Oncol* 2008;109(3):370–6. DOI: 10.1016/j.ygyno.2008.02.006
- Sugiyama T., Kamura T., Kigawa J. et al. Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer* 2000;88(11):2584–9.
- Ku F.-Ch., Wu R.-Ch., Yang L.-Y. et al. Clear cell carcinomas of the ovary have poorer outcomes compared with serous carcinomas: Results from a single-center Taiwanese study. *J Formos Med Assoc* 2018;117(2):117–25. DOI: 10.1016/j.jfma.2017.03.007
- Huang H.J., Yang L.Y., Tung H.J. et al. Management and clinical outcomes of patients with recurrent/progressive ovarian clear cell carcinoma. *J Formos Med Assoc* 2020;119(4):793–804. DOI: 10.1016/j.jfma.2019.11.018
- Hermanek P., Hutter R.V., Sobin L.H., Wittekind C. International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* 1999;86(12):2668–73.
- Rosenberg R., Friederichs J., Gertler R. et al. Prognostic evaluation and review of immunohistochemically detected disseminated tumor cells in peritumoral lymph nodes of patients with pN0 colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2004;19(5):430–7. DOI: 10.1007/s00384-003-0559-z
- Faerden A.E., Sjo O.H., Bukholm I.R. et al. Lymph node micrometastases and isolated tumor cells influence survival in stage I and II colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2011;54(2):200–6. DOI: 10.1007/DCR.0b013e3181fd4c7c
- Waldman S.A., Hyslop T., Schulz S. et al. Association of GUCY2C expression in lymph nodes with time to recurrence and disease-free survival in pN0 colorectal cancer. *JAMA* 2009;301(7):745–52. DOI: 10.1001/jama.2009.141
- Hyslop T., Weinberg D.S., Schulz S. et al. Occult tumor burden predicts disease recurrence in lymph node-negative colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17(10):3293–303. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3113
- Ohta Y., Suzuki T., Shiokawa A. et al. Expression of CD10 and cytokeratins in ovarian and renal clear cell carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2005;24(3):239–45. DOI: 10.1097/01.pgp.0000158533.28866.45
- Cooper D., Schermer A., Sun T.T. Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications, and limitations. *Lab Invest* 1985;52(3):243–56.
- Suzuki M., Ohwada M., Saga Y. et al. Micrometastatic p53-positive cells in the lymph nodes of early stage epithelial ovarian cancer: prognostic significance. *Oncology* 2001;60(2):170–5. DOI: 10.1159/000055315
- Maehara Y., Oshiro T., Endo K. et al. Clinical significance of occult micrometastasis lymph nodes from patients with early gastric cancer who died of recurrence. *Surgery* 1996;119(4):397–402. DOI: 10.1016/s0039-6060(96)80138-3
- Lee E., Chae Y., Kim I. et al. Prognostic relevance of immunohistochemically detected lymph node micrometastasis in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2002;94(11):2867–73. DOI: 10.1002/cncr.10562
- Yasuda K., Adachi Y., Shiraishi N. et al. Prognostic effect of lymph node micrometastasis in patients with histologically node-negative gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2002;9(8):771–4. DOI: 10.1007/BF02574499
- Juretka M.M., Jensen K.C., Longacre T.A. et al. Detection of pelvic lymph node micrometastasis in stage IA2-IB2 cervical cancer by immunohistochemical analysis. *Gynecol Oncol* 2004;93(1):107–11. DOI: 10.1016/j.ygyno.2003.11.033
- Lentz S.E., Muderspach L.I., Felix J.C. et al. Identification of micrometastases in histologically negative lymph nodes of early-stage cervical cancer patients. *Obstet Gynecol* 2004;103(6):1204–10. DOI: 10.1097/01.AOG.0000125869.78251.5e
- Delomenie M., Bonsang-Kitzis H., Bats A.S. et al. The clinical implication of lymph nodes micrometastases and isolated tumor cells in patients with cervical cancer: a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2019;241:71–6. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2019.08.010
- Amin M.B., Greene F.L., Edge S.B. et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin* 2017;67(2):93–9. DOI: 10.3322/caac.21388
- de Boer M., van Deurzen C.H., van Dijk J.A. et al. Micrometastases or isolated tumor cells and the outcome of breast cancer. *N Engl J Med* 2009;361(7):653–63. DOI: 10.1056/NEJMoa0904832
- Cote R.J., Peterson H.F., Chaiwun B. et al. Role of immunohistochemical detection of lymph-node metastases

- in management of breast cancer. International Breast Cancer Study Group. *Lancet* 1999;354(9182):896–900. DOI: 10.1016/S0140-6736(98)11104-2
28. Wong Y.P., Shah S.A., Shaari N. et al. Comparative analysis between multilevel sectioning with conventional haematoxylin and eosin staining and immunohistochemistry for detecting nodal micrometastases with stage I and II colorectal cancers. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(4):1725–30. DOI: 10.7314/apjcp.2014.15.4.1725
 29. Hara K., Kajita R., Torii K.U. et al. The secretory peptide gene *EPP1* enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes Dev* 2007;21(14):1720–5. DOI: 10.1101/gad.1550707
 30. Linden M.D., Zarbo R.J. Cytokeratin immunostaining patterns of benign, reactive lymph nodes: applications for the evaluation of sentinel lymph node specimen. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001;9(4):297–301. DOI: 10.1097/00129039-200112000-00002
 31. Hermanek P. pTNM and residual tumor classifications: problems of assessment and prognostic significance. *World J Surg* 1995;19(2):184–90. DOI: 10.1007/BF00308624
 32. Edwards B.K., Ward E., Kohler B.A. et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer* 2010;116(3):544–73. DOI: 10.1002/encr.24760
 33. Natrah M.S., Ezat S., Syed M.A. et al. Quality of life in Malaysian colorectal cancer patients: a preliminary result. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13(3):957–62. DOI: 10.7314/apjcp.2012.13.3.957
 34. American Joint Committee on Cancer. Ovary, fallopian tube, and primary peritoneal carcinoma. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th edn. New York, NY: Springer, 2017. P. 681–690.
 35. Akagi Y., Kinugasa T., Adachi Y., Shirouzu K. Prognostic significance of isolated tumor cells in patients with colorectal cancer in recent 10-year studies. *Mol Clin Oncol* 2013;1(4):582–92. DOI: 10.3892/mco.2013.116
 36. Cassidy J. Guidelines for adjuvant therapy in colorectal cancer. Are they useful? And to whom? *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2011;23(5):312–3. DOI: 10.1016/j.clon.2010.06.001
 37. Komukai S., Nishimaki T., Watanabe H. et al. Significance of immunohistochemically demonstrated micrometastases to lymph nodes in esophageal cancer with histologically negative nodes. *Surgery* 2000;127(1):40–6. DOI: 10.1067/msy.2000.102754
 38. Xi L., Coello M.C., Litle V.R. et al. A combination of molecular markers accurately detects lymph node metastasis in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006;12(8):2484–91. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2037
 39. Iddings D., Ahmad A., Elashoff D., Bilchik A. The prognostic effect of micrometastases in previously staged lymph node negative (N0) colorectal carcinoma: a meta-analysis. *Ann Surg Oncol* 2006;13(11):1386–92. DOI: 10.1245/s10434-006-9120-y
 40. Haince J.F., Houde M., Beaudry G. et al. Comparison of histopathology and RT-qPCR amplification of guanylyl cyclase C for detection of colon cancer metastases in lymph nodes. *J Clin Pathol* 2010;63(6):530–7. DOI: 10.1136/jcp.2009.072983
 41. Nicastrì D.G., Doucette J.T., Godfrey T.E., Hughes S.J. Is occult lymph node disease in colorectal cancer patients clinically significant? A review of the relevant literature. *J Mol Diagn* 2007;9(5):563–71. DOI: 10.2353/jmoldx.2007.070032
 42. Farshid G., Pradhan M., Kollias J., Gill P.G. Computer simulations of lymph node metastasis for optimizing the pathologic examination of sentinel lymph nodes in patients with breast carcinoma. *Cancer* 2000;89(12):2527–37.
 43. Dutta S.W., Volaric A., Morgan J.T. et al. Pathologic evaluation and prognostic implications of nodal micrometastases in breast cancer. *Semin Radiat Oncol* 2019;29(2):102–10. DOI: 10.1016/j.semradonc.2018.11.001

Вклад авторов

Ю.В. Алдущкина: определение концепции обзора, критический анализ собранных данных, координация процесса;
 Н.Ю. Анисимова: анализ данных литературы, написание текста рукописи;
 А.Н. Грицай, Ю.И. Должикова, О.А. Одарюк, Д.В. Филоненко: анализ данных литературы;
 К.М. Новрузов: оформление текста публикации.

Author's contributions

Yu.V. Aldushkina: definition of the concept of review, critical analysis of the collected data, coordination of the process;
 N.Yu. Anisimova: analysis of literature data, writing of the manuscript;
 A.N. Gritsai, Yu.I. Dolzhikova, O.A. Odaryuk, D.V. Filonenko: analysis of literature data;
 K.M. Novruzov: design of the text of the publication.

ORCID авторов / ORCID of authors

Ю.В. Алдущкина / Yu.V. Aldushkina: <https://orcid.org/0000-0002-9486-2028>
 Н.Ю. Анисимова / N.Yu. Anisimova: <https://orcid.org/0000-0002-4370-6578>
 А.Н. Грицай / A.N. Gritsai: <https://orcid.org/0000-0001-5235-6509>
 К.М. Новрузов / K.M. Novruzov: <https://orcid.org/0000-0002-0773-255X>
 Ю.И. Должикова / Yu.I. Dolzhikova: <https://orcid.org/0000-0003-2138-7323>
 О.А. Одарюк / O.A. Odaryuk: <https://orcid.org/0000-0001-5418-7403>
 Д.В. Филоненко / D.V. Filonenko: <https://orcid.org/0000-0002-9943-3054>

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Funding. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 30.10.2022. **Принята к публикации:** 24.04.2023.
Article received: 30.10.2022. **Accepted for publication:** 24.04.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-2-27-33>

Роль циркулирующей опухолевой ДНК в диагностике и оптимизации лечения локализованного и местно-распространенного рака поджелудочной железы

А.В. Шабунин^{1,2}, В.В. Птушкин^{1,3}, М.М. Тавобилов^{1,2}, К.С. Титов^{1,4}, Ю.Н. Кобзев¹,
А.А. Карпов¹, Е.Б. Кудряш²

¹ГБУЗ г. Москвы Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения города Москвы; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 5;

²ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1;

³ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1;

⁴ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

Контакты: Евгений Борисович Кудряш kudryash_e@mail.ru

Рак поджелудочной железы (РПЖ) – злокачественная высокоагрессивная опухоль, возникающая и растущая в условиях воспаления и тканевой гипоксии. При РПЖ одним из ключевых процессов в прогрессии опухоли является эпителиально-мезенхимальный переход, который приводит к ранней диссеминации и быстрой реализации метастатической болезни, что обуславливает низкие показатели общей выживаемости. Опухоль, высвобождая широкий спектр различных молекул (циркулирующую ДНК, экзосомы, протеины и липиды), позволяет идентифицировать и использовать их в качестве потенциальных диагностических и прогностических биомаркеров.

Данный обзор знакомит читателей с методикой жидкостной биопсии. Показаны основные направления применения метода у пациентов с протоковой аденокарциномой поджелудочной железы. Жидкостная биопсия – современный диагностический метод молекулярной онкологии, принцип которого заключается в определении циркулирующих опухолевых клеток, ДНК, экзосом в биологических жидкостях. Рассмотрены публикации, посвященные возможностям метода в оценке минимальной резидуальной болезни, оценке ответа опухоли на системную терапию и определении прогноза. Жидкостная биопсия особенно актуальна в случаях злокачественных опухолей труднодоступной локализации, в частности РПЖ. Современные методы морфологической верификации опухолей поджелудочной железы (тонкоигольная биопсия под эндосонографическим контролем и чрескожная биопсия) имеют существенные недостатки: низкая информативность, неоднократные повторные вмешательства, постманипуляционные осложнения (панкреатит, кровотечение и др.). Принимая во внимание очевидные преимущества жидкостной биопсии перед традиционными способами морфологической верификации, данный метод представляется перспективным диагностическим инструментом в персонализированной онкологии при РПЖ.

Ключевые слова: жидкостная биопсия, циркулирующая опухолевая ДНК, рак поджелудочной железы

Для цитирования: Шабунин А.В., Птушкин В.В., Тавобилов М.М. и др. Роль циркулирующей опухолевой ДНК в диагностике и оптимизации лечения локализованного и местно-распространенного рака поджелудочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(2):27–33. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-2-27-33

The role of circulating tumor DNA in diagnosis and optimization of treatment of localized and local pancreatic cancer

Aleksey V. Shabunin^{1,2}, Vadim V. Ptushkin^{1,3}, Michail M. Tavobilov^{1,2}, Konstantin S. Titov^{1,4}, Jury N. Kobzev¹,
Alexey A. Karpov¹, Evgeny B. Kudryash²

¹Botkin City Clinical Hospital of the Moscow Healthcare Department; 5th Botkinsky proezd, Moscow 125284, Russia;

²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education; Bld. 1, 2/1 BARRIKADNAYA St., Moscow 125993, Russia;

³Pirogov Russian National Research Medical University; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia;

⁴RUDN University; 6 Miklukho-Maklaya St., 117198 Moscow, Russia

Contacts: Evgeny Borisovich Kudryash kudryash_e@mail.ru

Pancreatic cancer (PC) is a malignant highly aggressive tumor that arises and grows under conditions of inflammation and tissue hypoxia. In PC, one of the key processes in progression is epithelial-mesenchymal transition, which leads to early dissemination and rapid realization of metastatic disease, which accounts for low overall survival rates. The tumor, by releasing a wide range of different molecules (circulating DNA, exosomes, proteins and lipids), allows to identify and use them as potential, diagnostic and prognostic biomarkers.

This review introduces readers to the liquid biopsy technique. The main applications of the technique in patients with ductal adenocarcinoma of the pancreas are shown. Liquid biopsy is a modern diagnostic method of molecular oncology, the principle of which is to detect circulating tumor cells, DNA, exosomes in biological fluids. Publications evaluating the potential of the method to assess minimal residual disease, evaluate tumor response to systemic therapy, and determine prognosis are discussed. Liquid biopsy is particularly relevant in cases of malignant tumors of difficult localization, in particular, PC. Modern methods of morphological verification of pancreatic tumors (fine needle biopsy under endosonographic control and percutaneous biopsy) have essential disadvantages: low information value, multiple repeated interventions, postmanipulative complications (pancreatitis, bleeding, etc.). Taking into consideration obvious advantages and perspectives of this method over traditional methods of morphological verification, liquid biopsy seems to be a promising diagnostic tool in personalized oncology for pancreatic cancer.

Keywords: liquid biopsy, circulating tumor DNA, pancreatic cancer

For citation: Shabunin A.V., Ptushkin V.V., Tavobilov M.M. et al. The role of circulating tumor DNA in diagnosis and optimization of treatment of localized and local pancreatic cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2023;22(2):27–33. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-2-27-33

Введение

Несмотря на все достижения современной клинической онкологии, рак поджелудочной железы (РПЖ) на сегодняшний день остается онкологическим заболеванием с весьма низкими показателями 3- и 5-летней общей выживаемости. Согласно последним эпидемиологическим данным, протоковая аденокарцинома поджелудочной железы как основной и наиболее частый морфологический вариант РПЖ занимает 14-е место в структуре онкологической заболеваемости. Пятилетняя общая выживаемость при данной злокачественной опухоли не превышает 10 % [1].

Рак поджелудочной железы — злокачественная опухоль, изначально возникающая и далее растущая в условиях тканевой гипоксии, что и приводит к ее высокой биологической активности. Раннее прогрессирование опухоли связано с эпителиально-мезенхимальным переходом, происходящим уже на начальных стадиях заболевания. С одной стороны, это имеет такие последствия, как ранняя диссеминация и быстрая реализация метастатической болезни, что приводит к высоким показателям смертности, а с другой — опухоль, продуцируя широкий спектр различных молекул (циркулирующую опухолевую ДНК (цодНК), протеины, липиды и экзосомы), позволяет идентифицировать и использовать их в качестве

потенциальных диагностических и прогностических биомаркеров [2].

Весьма скромные успехи в лечении РПЖ обусловлены многими факторами: трудности ранней диагностики, скудная клиническая картина на I–II стадиях, диссеминация опухоли даже на начальных стадиях заболевания. Ряд авторов утверждают, что протоковая аденокарцинома поджелудочной железы с самых ранних стадий является «нерезектабельным и системным опухолевым процессом» [3]. Невыявляемые стандартными методами диагностики отдаленные метастазы и интратуморальная гетерогенность делают данную опухоль резистентной к противоопухолевым лекарствам в большинстве случаев [3].

Начало XXI в. ознаменовалось прорывом в области молекулярной биологии, что послужило основой для разработки омиксных технологий, которые дают врачу возможность определения биомаркеров в биологических жидкостях организма, что позволяет персонализированно подойти к выбору варианта и последовательности лечения [4].

Одним из наиболее перспективных направлений молекулярной онкологии является методика жидкостной биопсии. Данный метод позволяет определять в биологических жидкостях продукты жизнедеятельности опухоли: циркулирующие опухолевые клетки, цодНК, циркулирующие РНК и экзосомы.

Данный обзор литературы сконцентрирован на работах, посвященных определению цоДНК у пациентов с протоковой аденокарциномой поджелудочной железы. В обзоре обсуждаются и суммируются современные возможности клинического применения методики жидкостной биопсии.

Определение и сущность методики жидкостной биопсии

Жидкостная биопсия – современный диагностический метод молекулярной онкологии. Суть методики заключается в определении циркулирующих опухолевых клеток, ДНК или экзосом в биологических жидкостях у онкологического пациента [5]. Данный метод позволяет минимально инвазивно получать опухолевый материал, оценивать динамику заболевания, определять прогноз [6]. Жидкостная биопсия особенно актуальна в случаях злокачественных опухолей труднодоступной локализации, в частности РПЖ. Технические сложности забора материала для стандартной биопсии, выраженное преобладание в опухоли стромы и интратуморальная гетерогенность не позволяют адекватно оценивать молекулярно-генетический пейзаж опухоли. Современные методы морфологической верификации опухолей поджелудочной железы (тонкоигольная биопсия под эндоскопическим контролем и чрескожная биопсия) имеют существенные недостатки: низкая информативность, неоднократные повторные вмешательства, постманипуляционные осложнения (панкреатит, кровотечение и др.) [7]. Указанные недостатки обуславливают более позднее начало системной лекарственной терапии, снижают шансы на проведение радикального оперативного вмешательства. Именно поэтому ряд авторов указывают на перспективы и возможности методики жидкостной биопсии, которая имеет множество преимуществ перед традиционными способами морфологической верификации [8–10].

Методы выделения циркулирующей опухолевой ДНК. Технические аспекты жидкостной биопсии

В настоящее время для качественного и количественного анализа опухолеспецифических мутаций используются новейшие высокоточные методы. Внедрены в клиническую практику цифровая капельная полимеразная цепная реакция (digital droplet polymerase chain reaction) и секвенирование нового поколения (next generation sequencing). В большинстве работ, посвященных выделению цоДНК из плазмы крови, использовались методики на основе полимеразной цепной реакции [11–13]. Технологии секвенирования нового поколения являются более чувствительными и более дорогостоящими [14].

Еще в 1983 г. В. Shapiro и соавт. выявили наличие цоДНК у пациентов с протоковой аденокарциномой [15]. Мутации в гене *KRAS* являются иницирующим событием в канцерогенезе [16]. Более чем в 90 % случаев интраэпителиальной неоплазии поджелудочной железы обнаруживаются мутации в гене *KRAS* [12].

В настоящее время большинство авторов склонны считать, что частота выявления цоДНК и ее количественная оценка коррелируют с объемом опухолевой массы (опухолевой нагрузкой). При метастатическом процессе первичная опухоль и вторичные очаги продуцируют высокий пул цоДНК в кровотоке, что приближает чувствительность метода к 100 % [17, 18]. В противном случае при резектабельной опухоли без макromетастазов количество цоДНК значимо ниже, что, вероятно, требует применения высокочувствительных и дорогостоящих методик выявления во избежание ложноотрицательных результатов. Данная гипотеза позволяет использовать уровень цоДНК в качестве маркера объема опухолевой массы. Количественное определение цоДНК позволяет оценивать радикальность оперативного вмешательства, минимальную резидуальную болезнь на основании уровня цоДНК до и после вмешательства [19].

Кроме того, определение цоДНК позволяет оценивать динамику ответа опухоли на системную лекарственную терапию. Существуют экспериментальные работы, показывающие возможности метода в качестве скрининга и ранней диагностики у пациентов с предопухолевыми заболеваниями (кистозные неоплазии поджелудочной железы, хронический панкреатит и др.) [20–22]. Авторами показаны возможности определения *KRAS*-мутаций у пациентов с кистозными опухолями поджелудочной железы (внутрипротоковая папиллярная муцинозная опухоль, муцинозная цистаденома). Определение мутаций цоДНК в плазме, жидкости кист позволяет выявлять малигнизацию опухолей задолго до появления радиологических признаков. Полученные результаты могут оказывать существенное влияние на тактику ведения пациентов.

Количественный мониторинг уровня циркулирующей опухолевой ДНК для оценки ответа опухоли на системную противоопухолевую терапию

Использование цоДНК в качестве маркера ответа опухоли на лекарственную терапию является многообещающей диагностической возможностью жидкостной биопсии. В настоящее время для этого в онкологии используются различные методы лучевой диагностики (компьютерная и магнитно-резонансная томография, позитронно-эмиссионная томография, совмещенная с компьютерной томографией), а также белковые онкомаркеры (СА 19-9, СА 125, раковый эмбриональный антиген и α -фетопротеин) [23].

Данные методы оценки динамики развития опухолевого процесса имеют существенные недостатки: субъективная оценка изменения конфигурации опухолевых очагов (плотность, распад, границы и др.) не всегда отражает истинную динамику течения онкологического заболевания. Белковые маркеры, одобренные FDA (Food and Drug Administration, Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США), не обладают высокой чувствительностью и специфичностью, кроме того, их уровень может быть повышен при многих доброкачественных процессах, воспалении и др. [24]. Многие онкомаркеры присутствуют в системном кровотоке длительное время, что затрудняет их использование в качестве диагностического показателя в динамике. Использование цоДНК как средства мониторинга течения опухолевого процесса имеет целый ряд потенциальных преимуществ перед методами, применяемыми в настоящее время. цоДНК имеет относительно короткий период полувыведения (около 2 ч), что позволяет оценивать динамику опухолевой нагрузки в процессе как хирургического, так и системного лекарственного лечения. В отличие от онкомаркеров, определение цоДНК является более специфичным диагностическим методом, так как мутации, выявляемые в цоДНК (в частности, *KRAS* для РПЖ), характерны исключительно для опухолевых клеток. Вышеперечисленные преимущества подталкивают исследователей к активному внедрению данного метода в клиническую практику [25].

В настоящее время проводится крупное мультицентровое исследование DYNAMIC PANCREAS, в котором оценивают эффективность адъювантной химиотерапии в зависимости от динамики цоДНК. В исследование включены пациенты с ранними стадиями протоковой аденокарциномы поджелудочной

железы, перенесшие радикальное хирургическое лечение на первом этапе [26].

В табл. 1 приведены основные исследования [19, 27], посвященные количественному мониторингу цоДНК для оценки ответа опухоли на системную терапию.

J. V. Bacht и соавт. оценивали динамику уровня мутаций *KRAS* в цоДНК у пациентов с протоковой аденокарциномой поджелудочной железы, получавших системную химиотерапию по схеме FOLFOX или гемцитабин ± эриаспаза. Сто тринадцать пациентов были разделены на 3 группы: с отсутствием цоДНК; со снижением уровня цоДНК в процессе химиотерапии (responders); с увеличением или стабилизацией уровня цоДНК в процессе химиотерапии (non-responders). Авторами было показано, что выявление цоДНК в системном кровотоке явилось независимым негативным прогностическим фактором (общая выживаемость составила 4,6 мес и 8,8 мес, $p < 0,0025$). Также было отмечено, что общая выживаемость в группах с отсутствием цоДНК, снижением уровня цоДНК в процессе терапии и увеличением/стабилизацией уровня цоДНК в процессе терапии составила 11,7; 6,5; 4,3 мес соответственно [28].

Количественный мониторинг уровня цоДНК для оценки минимальной резидуальной болезни при раке поджелудочной железы. Прогностическая значимость метода

Определение цоДНК у пациентов с протоковой аденокарциномой поджелудочной железы является перспективным прогностическим методом. Количественное определение уровня цоДНК до и после хирургического лечения позволяет делать выводы о радикальности проведенного оперативного вмешательства. Даже радикальная операция при РПЖ

Таблица 1. Исследования, посвященные количественному мониторингу уровня циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) для оценки ответа опухоли на системную терапию

Table 1. Studies on quantitative monitoring of circulating tumor DNA (ctDNA) levels to assess tumor response to systemic therapy

Автор, год Author, year	Дизайн исследования Research design	Результаты Results
S. Kruger и соавт., 2018 ($n = 54$) [27] S. Kruger et al., 2018 ($n = 54$) [27]	Еженедельная оценка уровня цоДНК у пациентов, получающих химиотерапию Weekly assessment of ctDNA levels in patients receiving chemotherapy	Корреляция уровня цоДНК у пациентов со стабилизацией процесса и прогрессированием. Повышение уровня цоДНК свидетельствует о прогрессировании заболевания. Чувствительность – 83 %, специфичность – 100 % при выявлении прогрессирования Correlation of ctDNA levels in patients with process stabilization and progression. An increase in the level of ctDNA indicates disease progression. Sensitivity 83 %, specificity 100 % in detecting progression
S. Hussung и соавт., 2021 ($n = 17$) [19] S. Hussung et al., 2021 ($n = 17$) [19]	Количественная оценка цоДНК у пациентов, получающих адъювантную химиотерапию Quantitative assessment of ctDNA in patients receiving adjuvant chemotherapy	Высокие показатели цоДНК во время проведения адъювантной химиотерапии коррелировали с худшей общей выживаемостью High ctDNA scores during adjuvant chemotherapy correlated with worse overall survival

Таблица 2. Исследования, посвященные прогностической значимости циркулирующей опухолевой ДНК, оценке минимальной резидуальной болезни при раке поджелудочной железы

Table 2. Studies on the prognostic value of circulating tumor DNA, assessment of minimal residual disease in pancreatic cancer

Автор, год Author, year	Дизайн исследования Research design	Результаты Results
S. Guo и соавт., 2020 (n = 113) [30] S. Guo et al., 2020 (n = 113) [30]	Пациенты с I–III стадией заболевания; время взятия материала – до оперативного вмешательства Patients with stage I–III of disease; time of material collection – before surgical intervention	ВВП: цоДНК(+) – 9,2 мес, цоДНК(–) – 18,9 мес ОВ: цоДНК(+) – 17,1 мес, цоДНК(–) – 26,3 мес PFS: ctDNA(+) – 9.2 months, ctDNA(–) – 18.9 months OS: ctDNA(+) – 17.1 months, ctDNA(–) – 26.3 months
J. Earl и соавт., 2015 (n = 45) [31] J. Earl et al., 2015 (n = 45) [31]	Пациенты с резектабельными, местно-распространенными, метастатическими формами рака предстательной железы; время взятия материала – до начала системной терапии Patients with resectable, locally advanced, metastatic forms of pancreatic cancer; time of collection – before the start of systemic therapy	ОВ: цоДНК(+) – 60 дней, цоДНК(–) – 772 дня OS: ctDNA(+) – 60 days, ctDNA(–) – 772 days
E. Takai и соавт., 2015 (n = 259) [32] E. Takai et al., 2015 (n = 259) [32]	Пациенты с I–IV стадией заболевания, время взятия материала – до начала системной терапии Patients with stages I–IV of disease, time of collection – before the start of systemic therapy	ОВ: цоДНК(+) – 9 мес, цоДНК(–) – 24 мес OS: ctDNA(+) – 9 months, ctDNA(–) – 24 months
J. Tie и соавт., 2021 (n = 97) [33] J. Tie et al., 2021 (n = 97) [33]	Пациенты, перенесшие панкреатодуоденэктомию; время взятия материала – послеоперационный период Patients who underwent pancreatoduodenectomy; time of material collection – postoperative period	Значение цоДНК выше у пациентов с метастазами в лимфатических узлах The ctDNA value is higher in patients with lymph node metastases
V.P. Groot и соавт., 2019 (n = 59) [11] V.P. Groot et al., 2019 (n = 59) [11]	Пациенты с раком предстательной железы до и после оперативного вмешательства Patients with pancreatic cancer before and after surgical intervention	До операции цоДНК – независимый негативный фактор прогноза. Послеоперационное выявление цоДНК – худшие показатели ВВП (5 мес) и ОВ (15 мес) Preoperative ctDNA is an independent negative prognostic factor. Postoperative detection of ctDNA – worse PFS (5 months) and OS (15 months)
V. Lee и соавт., 2019 (n = 81) [9] V. Lee et al., 2019 (n = 81) [9]	Пациенты с I–II стадией заболевания до и после оперативного вмешательства Patients with stages I–II of disease before and after surgical intervention	Послеоперационное выявление цоДНК коррелировало с худшей ВВП и ОВ; у всех пациентов с цоДНК после операции – рецидив Postoperative detection of ctDNA correlated with worse PFS and OS; all patients with ctDNA postoperatively relapsed

Примечание. цоДНК(+) – циркулирующая опухолевая ДНК обнаружена; цоДНК(–) – отсутствие циркулирующей опухолевой ДНК; ВВП – выживаемость без прогрессирования; ОВ – общая выживаемость.

Note. ctDNA(+) – circulating tumor DNA detected; ctDNA(–) – circulating tumor DNA was not detected; PFS – progressive-free survival; OS – overall survival.

в большинстве случаев не приводит к высоким показателям общей выживаемости. Наличие так называемой минимальной остаточной (резидуальной) опухоли, ее микрометастазов, не определяемых стандартными методами диагностики, является причиной прогрессирования. Большинство авторов указывают, что наличие в крови цоДНК в послеоперационном периоде является негативным прогностическим фактором [24, 29]. В табл. 2 приведены основные публикации [9, 11, 30–33], посвященные определению

цоДНК для оценки минимальной резидуальной болезни, прогностической значимости метода.

Заключение

Таким образом, жидкостная биопсия является многообещающим и перспективным методом скрининга, а также опцией комплексной диагностики и фактором индивидуального прогноза заболевания при РПЖ. В последние годы в современной онкологии наблюдается заметный прорыв в диагностике и лечении

различных злокачественных новообразований, достигнутый на стыке клинических и фундаментальных научных подходов. Жидкостная биопсия может стать методом выбора уже в ближайшем будущем. На сегодняшний день благодаря доступным высоким технологиям (молекулярно-генетические методы диагностики злокачественных опухолей, такие как секвенирование нового поколения) анализ ДНК ста-

новится более точным, что позволяет количественно определять цоДНК у онкологических пациентов с низкой опухолевой нагрузкой. Несомненно, требуется проведение масштабных мультицентровых исследований, посвященных жидкостной биопсии и оценке цоДНК, при доказанной эффективности которых данный метод будет внедрен в рутинную онкологическую практику.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Lippi G., Mattiuzzi C. The global burden of pancreatic cancer. *Arch Med Sci* 2020;16(4):820–4. DOI: 10.5114/AOMS.2020.94845
- Zhao R., Ren S., Li C. et al. Biomarkers for pancreatic cancer based on tissue and serum metabolomics analysis in a multicenter study. *Cancer Med* 2023;12(4):5158–71. DOI: 10.1002/cam4.5296
- Mönkemüller K., Fry L.C., Malfertheiner P. Pancreatic cancer is “always non-resectable”. *Digestive Diseases* 2007;25(3):285–8. DOI: 10.1159/000103904
- Turanli B., Yildirim E., Gulfidan G. et al. Current state of “omics” biomarkers in pancreatic cancer. *J Pers Med* 2021;11(2):127. DOI: 10.3390/jpm11020127
- Пасечникова Е.А., Бодня В.Н., Шаров С.В. и др. Жидкостная биопсия: современное состояние проблемы. *Инновационная медицина Кубани* 2021;(3):57–63. DOI: 10.35401/2500-0268-2021-23-3-57-63
Pasechnikova E.A., Bodnya V.N., Sharov S.V. et al. Liquid biopsy: the current state of the issue. *Innovatsionnaya meditsina Kubany = Innovative Medicine of Kuban* 2021;(3):57–63. (In Russ.). DOI: 10.35401/2500-0268-2021-23-3-57-63
- Попова А.С., Федянин М.Ю., Покатаев И.А., Тюляндин С.А. Метаанализ исследований, посвященных прогностической значимости циркулирующей опухолевой ДНК при раке поджелудочной железы. *Современная онкология* 2020;22(3):127–32. DOI: 10.26442/18151434.2020.3.200190
Popova A.S., Fedyanin M.Yu., Pokataev I.A., Tyulyandin S.A. Meta-analysis of the studies dedicated to the predictive significance of circulating tumor DNA in pancreatic cancer. *Sovremennaya onkologiya = Journal of Modern Oncology* 2020;22(3):127–32. (In Russ.). DOI: 10.26442/18151434.2020.3.200190
- Banafea O., Pius Mghanga F., Zhao J. et al. Endoscopic ultrasonography with fine-needle aspiration for histological diagnosis of solid pancreatic masses: a meta-analysis of diagnostic accuracy studies. *BMC Gastroenterol* 2016;16(1):108. DOI:10.1186/s12876-016-0519-z
- Perales S., Torres C., Jimenez-Luna C. et al. Liquid biopsy approach to pancreatic cancer. *World J Gastrointest Oncol* 2021;13(10):1263–87. DOI: 10.4251/wjgo.v13.i10.1263
- Lee B., Lipton L., Cohen J. et al. Circulating tumor DNA as a potential marker of adjuvant chemotherapy benefit following surgery for localized pancreatic cancer. *Ann Oncol* 2019;30(9):1472–8. DOI: 10.1093/annonc/mdz200
- Жуков Н.В., Зарецкий А.Р., Лукьянов С.А., Румянцев С.А. Исследование циркулирующей опухолевой ДНК (жидкая биопсия). Перспективы использования в онкологии. *Онкогематология* 2014;9(4):28–36. DOI: 10.17650/1818-8346-2014-9-4-28-36
Zhukov N.V., Zaretskiy A.R., Lukyanov S.A., Rumyantsev S.A. Circulating tumor DNA detection (liquid biopsy): prospects in oncology. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2014;9(4):28–36. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2014-9-4-28-36
- Groot V.P., Mosier S., Javed A.A. et al. Circulating tumor DNA as a clinical test in resected pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2019;25(16):4973–84. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0197
- Ako S., Kato H., Nouse K. et al. Plasma KRAS mutations predict the early recurrence after surgical resection of pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther* 2021;22(10–12):564–70. DOI: 10.1080/15384047.2021.1980312
- Del Re M., Vivaldi C., Rofi E. et al. Early changes in plasma DNA levels of mutant KRAS as a sensitive marker of response to chemotherapy in pancreatic cancer. *Sci Rep* 2017;7(1):7931. DOI: 10.1038/s41598-017-08297-z
- Zhu Y., Zhang H., Chen N. et al. Diagnostic value of various liquid biopsy methods for pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2020;99(3):e18581. DOI:10.1097/MD.00000000000018581
- Shapiro B., Chakrabarty M., Cohn E.M., Leon S.A. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 1983;51(11):2116–20. DOI: 10.1002/1097-0142(19830601)51:11<2116::aid-cnrc2820511127>3.0.co;2-s
- Makohon-Moore A., Iacobuzio-Donahue C.A. Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective. *Nat Rev Cancer* 2016;16(9):553–65. DOI: 10.1038/nrc.2016.66
- Pietrasz D., Sereni E., Lancelotti F. et al. Circulating tumour DNA: a challenging innovation to develop “precision oncology” in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2022;126(12):1676–83. DOI: 10.1038/s41416-022-01745-2
- Cheng H., Liu C., Jiang J. et al. Analysis of ctDNA to predict prognosis and monitor treatment responses in metastatic pancreatic cancer patients. *Int J Cancer* 2017;140(10):2344–50. DOI:10.1002/ijc.30650
- Hussung S., Ahoundova D., Hipp J. et al. Longitudinal analysis of cell-free mutated KRAS and CA 19-9 predicts survival following curative resection of pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2021;21(1):49. DOI: 10.1186/s12885-020-07736-x
- Yang J., Xu R., Wang C. et al. Early screening and diagnosis strategies of pancreatic cancer: a comprehensive review. *Cancer Commun (Lond)* 2021;41(12):1257–74. DOI: 10.1002/cac2.12204
- Kaur S., Jain M., Batra S.K. Liquid biopsy for identification of high-risk cystic lesions of pancreas. *Gastroenterology* 2021;160(4):1016–8. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.12.039
- Lee J.H., Kim Y., Choi J.W., Kim Y.S. KRAS, GNAS, and RNF43 mutations in intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas: a meta-analysis. *Springerplus* 2016;5(1):1172. DOI: 10.1186/s40064-016-2847-4
- Zheng-Lin B., O’Reilly E.M. Pancreatic ductal adenocarcinoma in the era of precision medicine. *Semin Oncol* 2021;48(1):19–33. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2021.01.005
- Ueberroth B.E., Jones J.C., Bekaii-Saab T.S. Circulating tumor DNA (ctDNA) to evaluate minimal residual disease (MRD),

- treatment response, and posttreatment prognosis in pancreatic adenocarcinoma: ctDNA and MRD in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology* 2022;22(6):741–8. DOI: 10.1016/j.pan.2022.06.009
25. Sivapalan L., Kocher H.M., Ross-Adams H., Chelala C. Molecular profiling of ctDNA in pancreatic cancer: Opportunities and challenges for clinical application. *Pancreatology* 2021;21(2):363–78. DOI: 10.1016/j.pan.2020.12.017
 26. Circulating tumour DNA analysis informing adjuvant chemotherapy in early stage pancreatic cancer: a multicentre randomised study (DYNAMIC- Pancreas). Available at: <https://trialssearch.who.int/Trial2.aspx?TrialID=ACTRN12618000335291>. DOI: 10.1002/central/cn-01898069
 27. Kruger S., Heinemann V., Ross C. et al. Repeated ^{mut}KRAS ctDNA measurements represent a novel and promising tool for early response prediction and therapy monitoring in advanced pancreatic cancer. *Ann Oncol* 2018;29(12):2348–55. DOI: 10.1093/annonc/mdy417
 28. Bachet J.B., Blons H., Hammel P. et al. Circulating tumor DNA is prognostic and potentially predictive of eraspace efficacy in second-line in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2020;26(19):5208–16. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0950
 29. Kitahata Y., Kawai M., Hirono S. et al. Circulating tumor DNA as a potential prognostic marker in patients with borderline-resectable pancreatic cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy followed by pancreatectomy. *Ann Surg Oncol* 2021;29(3):1596–605. DOI: 10.1245/s10434-021-10985-0
 30. Guo S., Shi X., Shen J. et al. Preoperative detection of KRAS G12D mutation in ctDNA is a powerful predictor for early recurrence of resectable PDAC patients. *Br J Cancer* 2020;122(6):857–67. DOI: 10.1038/S41416-019-0704-2
 31. Earl J., Garcia-Nieto S., Martinez-Avila J.C. et al. Circulating tumor cells (CTC) and KRAS mutant circulating free DNA (ctDNA) detection in peripheral blood as biomarkers in patients diagnosed with exocrine pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2015;15:797. DOI: 10.1186/S12885-015-1779-7
 32. Takai E., Totoki Y., Nakamura H. et al. Clinical utility of circulating tumor DNA for molecular assessment in pancreatic cancer. *Sci Rep* 2015;5:18425. DOI: 10.1038/srep18425
 33. Tie J., Wang Y., Tomasetti C. et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 2016;8(346):346ra92. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf6219

Вклад авторов

А.В. Шабунин: концепция работы и дизайн исследования, научное руководство;
 В.В. Птушкин: концепция работы и дизайн исследования, редактирование текста статьи;
 М.М. Тавобилов: редактирование текста статьи, научное руководство;
 К.С. Титов: сбор и анализ данных, редактирование текста статьи;
 Ю.Н. Кобзев: написание текста статьи, перевод на английский язык;
 А.А. Карпов: написание текста статьи, подготовка к публикации;
 Е.Б. Кудряш: сбор и анализ данных литературы, написание текста статьи, подготовка к публикации.

Authors contributions

A.V. Shabunin: conception of work and research design, scientific guidance;
 V.V. Ptushkin: conception of work and research design, editing of the article;
 M.M. Tavobilov: editing of the article, scientific guidance;
 K.S. Titov: data collection and analysis, editing of the article;
 Yu. N. Kobzev: article writing, translation into English;
 A.A. Karpov: article writing, preparation for publication;
 E.B. Kudryash: collection and analysis of data from the literature, article writing, preparation for publication.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.В. Шабунин / A.V. Shabunin: <https://orcid.org/0000-0002-4230-8033>
 В.В. Птушкин / V.V. Ptushkin: <https://orcid.org/0000-0002-9368-6050>
 М.М. Тавобилов / M.M. Tavobilov: <https://orcid.org/0000-0003-0335-1204>
 К.С. Титов / K.S. Titov: <https://orcid.org/0000-0003-4460-9136>
 Ю.Н. Кобзев / Yu. N. Kobzev: <https://orcid.org/0000-0003-0362-1905>
 А.А. Карпов / A.A. Karpov: <https://orcid.org/0000-0002-5142-1302>
 Е.Б. Кудряш / E.B. Kudryash: <https://orcid.org/0000-0002-7870-808X>

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Funding. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 08.02.2023. **Принята к публикации:** 24.04.2023.
Article received: 08.02.2023. **Accepted for publication:** 24.04.2023.

Рак желудка и мезотелиома брюшины – редкий случай синхронного рака. Клиническое наблюдение

А.Г. Абдуллаев¹, Н.А. Козлов², И.С. Стилиди²

¹ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Амир Гусейнович Абдуллаев amirido@mail.ru

Первично-множественные злокачественные новообразования в Российской Федерации развиваются примерно у 9 % онкологических пациентов, при этом синхронные опухоли выявляют у четверти из них, что диктует необходимость обязательного мультидисциплинарного подхода к выбору лечения. Локализация синхронных первично-множественных опухолей в одной анатомической зоне требует качественной интерпретации данных инструментальных методов диагностики и проведения морфологического анализа после биопсии каждой опухоли. Наряду с этим существует вероятность ошибочного мнения о наличии разной гистологической структуры выявленных опухолей, и данные визуальных методов оценки интерпретируются в пользу какого-то одного заболевания.

В настоящей работе представлено клиническое наблюдение редкого сочетания опухолей – аденокарциномы желудка и мезотелиомы брюшины. Случай обсужден на мультидисциплинарном консилиуме с участием хирурга, химиотерапевта и радиолога. Учитывая клиническую стадию рака тела желудка cT3N1M0 (III стадия), было принято решение о проведении на первом этапе предоперационной полихимиотерапии. Повторная диагностическая лапароскопия не выявила отрицательной динамики, множественные мелкие отсевы по брюшине сохранялись. В последующем была выполнена операция в объеме гастрэктомии, тотальной париетальной перитонеотомии и аппендэктомии без макроскопических признаков резидуальной опухоли. От внутрибрюшной химиоперфузии с гипертермией было решено воздержаться в связи с большим объемом операции и предшествующими 8 курсами полихимиотерапии. При микроскопическом исследовании в измененной части стенки желудка была обнаружена остаточная аденокарцинома (тип по Lauren – кишечный) с признаками лечебного патоморфоза G₃ (по Mandard), прораставшая в субсерозный слой и клетчатку малого сальника, с признаками периневральной инвазии при отсутствии сосудистой инвазии; края резекции – R0. На поверхности удаленных фрагментов брюшины были обнаружены разнокалиберные очаги злокачественной эпителиоидной мезотелиомы. При контрольном обследовании через год по данным компьютерной томографии и эзофагогастроуденоскопии признаки прогрессирования не выявлены, состояние пациентки удовлетворительное.

Ключевые слова: рак желудка, мезотелиома брюшины, циторедуктивные операции, иммуногистохимическое исследование

Для цитирования: Абдуллаев А.Г., Козлов Н.А., Стилиди И.С. Рак желудка и мезотелиома брюшины – редкий случай синхронного рака. Клиническое наблюдение. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(2):34–40. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-2-34-40

Gastric carcinoma and peritoneal mesothelioma – a rare case of synchronous cancer. Clinical observation

Amir G. Abdullaev¹, Nikolay A. Kozlov², Ivan S. Stilidi²

¹Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University); Bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia

Primary-multiple malignant neoplasms develop in about 9 % of cancer patients in the Russian Federation, while synchronous tumors are detected in a quarter of them, which dictates the need for a mandatory multidisciplinary approach to the choice of treatment. Localization of synchronous primary-multiple tumors in one anatomical zone requires a qualitative interpretation of instrumental diagnostic methods and morphological analysis after biopsy of each tumor. Along with this, there is a possibility of an erroneous opinion about the presence of different histological structures of the detected tumors and the data of visual assessment methods are interpreted in favor of a single disease.

This paper presents a clinical observation of a rare combination of gastric adenocarcinoma and peritoneal mesothelioma. The case was discussed at a multidisciplinary consultation with the participation of a surgeon, a chemotherapist and a radiologist. Taking into account the clinical stage of gastric body cancer cT3N1M0, III stage, it was decided to conduct preoperative polychemotherapy at the first stage. Repeated diagnostic laparoscopy revealed no negative dynamics, multiple small dropouts in the peritoneum persisted. Subsequently, the operation was performed in the volume of gastrectomy, total parietal peritomy and appendectomy without macroscopic signs of a residual tumor. It was decided to refrain from intra-abdominal chemoperfusion with hyperthermia due to the large volume of surgery and the previous 8 courses of polychemotherapy. Microscopic examination of the altered part of the stomach wall revealed residual adenocarcinoma (type according to Lauren – intestinal) with signs of therapeutic pathomorphosis G₃ (according to Mandard), which had grown into the subserous layer and the fiber of the small omentum, with signs of perineural invasion, in the absence of vascular invasion; resection edges – R0. On the surface of the removed fragments of the peritoneum, various foci of malignant epithelioid mesothelioma were found. At the control examination a year later, according to computed tomography and esophagogastroduodenoscopy, there were no signs of progression, the patient's condition was satisfactory.

Keywords: stomach cancer, peritoneal mesothelioma, cytoreductive surgery, immunohistochemical study

For citation: Abdullaev A.G., Kozlov N.A., Stilidi I.S. Gastric carcinoma and peritoneal mesothelioma – a rare case of synchronous cancer. Clinical observation. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(2):34–40. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-2-34-40

Введение

Частота первично-множественных онкологических заболеваний, согласно проведенным ранее эпидемиологическим исследованиям, колеблется от 2,4 до 17 % [1]. Однако последние данные свидетельствуют о том, что процент пациентов с синхронными и метахронными первично-множественными онкологическими заболеваниями может быть значительно выше. Эти тенденции связывают с увеличением средней продолжительности жизни, так как именно у пожилых пациентов повышается частота первично-множественных онкологических заболеваний.

Заболеваемость раком желудка (РЖ) в России в среднем составляет 30 тыс. случаев в год с летальностью в первый год с момента установления диагноза около 40 % [1]. Как правило, развитие РЖ носит спорадический характер, хотя отмечаются и случаи влияния наследственных факторов. Среди последних выделяют диффузный РЖ, при котором имеются мутации в гене *CDH1*, обеспечивающем клеточную адгезию за счет молекулы E-кадгерина, а также синдромы Линча, ювенильного полипоза, Пейтца–Егерса (Peutz–Jeghers). Кроме того, среди возможных причин развития РЖ многие авторы указывают инфицирование *Helicobacter pylori* и наличие фоновых заболеваний (атрофический гастрит, аденоматозные полипы, гипертрофическая гастропатия и др.). Однако в большинстве случаев выяснить причину развития болезни не удается [2–4].

Известно, что продолжительное воздействие асбеста является канцерогенным фактором и может привести к развитию целого ряда злокачественных новообразований, включая мезотелиому [5–10]. Тем не менее аспекты, касающиеся способа абсорбции (вдыхание или пероральный прием загрязненной воды), времени и типа воздействия (профессиональное или экологическое), концентрации и взаимосвязи между различными волокнами асбеста и вариантом опухоли до конца не выяснены [11], а имеющаяся подтверждение статистика в основном относится к мезотелиоме плевры. В нашем опыте лечения 89 пациентов с мезотелиомой брюшины анамнестическую роль длительного воздействия асбеста не удалось установить ни в одном случае. В описываемом клиническом наблюдении представлен случай сочетания РЖ и эпителиоидной мезотелиомы брюшины. При анализе доступной литературы мы не встретили описания подобного случая, хотя имелось указание на сочетание мезотелиомы брюшины с колоректальным раком у пациентов с длительным воздействием асбеста [12].

Материалы и методы

Пациентка – женщина в возрасте 66 лет. Известно, что в течение 40 лет работала раскладчиком лекал на швейном предприятии, где, со слов пациентки, часто контактировала с мелом и органической пылью. В последующем 8 лет работала на складе готовых

изделий. В марте 2021 г. пациентка обратилась к врачу по месту жительства по поводу дискомфорта в эпигастриальной области. При гастроскопии выявлен РЖ. Пациентка обратилась в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России для дообследования и определения тактики лечения.

С целью уточнения диагноза были проведены клиническое обследование пациентки и морфологическое исследование биоптатов опухоли. Вырезку и макрописание препаратов операционного материала проводили согласно требованиям протоколов CAP (College of American Pathologists, Колледж американских патологов) и ICCR (International Collaboration on Cancer Reporting, Международное сотрудничество в области отчетности о раковых заболеваниях). Гистологические препараты изготавливали по стандартизированной методике с использованием аппаратной проводки Leica, окраску депарафинизированных срезов и заключение под покровное стекло осуществляли на автоматизированной платформе Dako Coverstainer (Aligent, США).

Для верификации диагноза была использована панель антител, включавшая кадгерин-17 (клон SP183, Cell Marque), CDX-2 (клон EPR2764Y, Cell Marque), подоплайн (клон D2-40, Ventana), CK5/6 (клон D5, Ventana), кальретинин (клон SP65, Ventana), WT-1 (клон 6F-H2, Ventana) (Roche Ventana, США). Изготовление иммуногистохимических препаратов осуществляли на автоматизированной платформе Ventana Ultra (Roche Ventana, США) в соответствии с рекомендациями производителя антител.

Результаты

При компьютерной томографии органов брюшной полости (июнь 2021 г.) было отмечено, что стенки желудка на уровне тела, вдоль малой кривизны в кардиальном отделе, утолщены до 1–1,7 см (рис. 1); уплотнена клетчатка вдоль малой кривизны и между желудком и поджелудочной железой; визуализируется группа лимфатических узлов вдоль левой желудочной артерии – 5–7 мм по короткой оси и до 8 мм по длиннику; в воротах печени лимфатические узлы размерами до 5 мм по короткой оси; портокавальный узел – 1,0 × 0,7 см в поперечнике; свободная жидкость в брюшной полости не обнаружена.

Эзофагогастродуоденоскопия (ЭГДС) (июнь 2021 г.): начиная с проксимальной трети тела желудка по малой кривизне с переходом на переднюю и заднюю стенки определяется опухоль в виде язвенного дефекта и массивной прилежащей опухолевой инфильтрации с бугристой поверхностью; в проксимальном направлении опухоль распространяется на среднюю и верхнюю трети тела желудка. При эндоскопическом ультразвуковом исследовании визу-

ализируется массивное гипоехогенное образование, исходящее из слизистого слоя стенки желудка и распространяющееся на подслизистый и мышечный слой стенки, местами нельзя исключить врастание в наружный слой; толщина стенки достигает 14 мм, структура слоев не прослеживается; по ходу малой кривизны визуализируются множественные лимфатические узлы размерами 4–7 мм в диаметре.

При последующем гистологическом исследовании новообразования желудка была верифицирована высокодифференцированная аденокарцинома желудка (кишечный тип по Lauren).

Пациентке была проведена диагностическая лапароскопия (июль 2021 г.). Отмечено отсутствие асцита, а также наличие на париетальном и висцеральном листках брюшины, преимущественно на куполах диафрагмы и большом сальнике, множественных просовидных очажков диаметром до 3 мм. Иной патологии в брюшной полости не выявлено. Участок париетальной брюшины в области левого купола диафрагмы был взят на гистологическое исследование для уточнения его природы и стадирования основного заболевания. При гистологическом исследовании биоптата брюшины была обнаружена инфильтративно растущая эпителиоидноклеточная опухоль, формирующая тубулярные и сосочковые структуры из клеток со светоптическими признаками мезотелиальной дифференцировки. Для уточнения линии дифференцировки опухоли брюшины проведено иммуногистохимическое исследование. Панель антител включала маркеры желудочно-кишечной дифференцировки (кадгерин-17 и CDX-2 для аденокарциномы желудка) и маркеры мезотелиальной дифференцировки (подоплайн, CK5/6, кальретинин, WT-1),



Рис. 1. Компьютерная томография до лечения: утолщенные стенки желудка (стрелка)

Fig. 1. Pre-treatment computed tomography: thickened stomach wall (arrow)

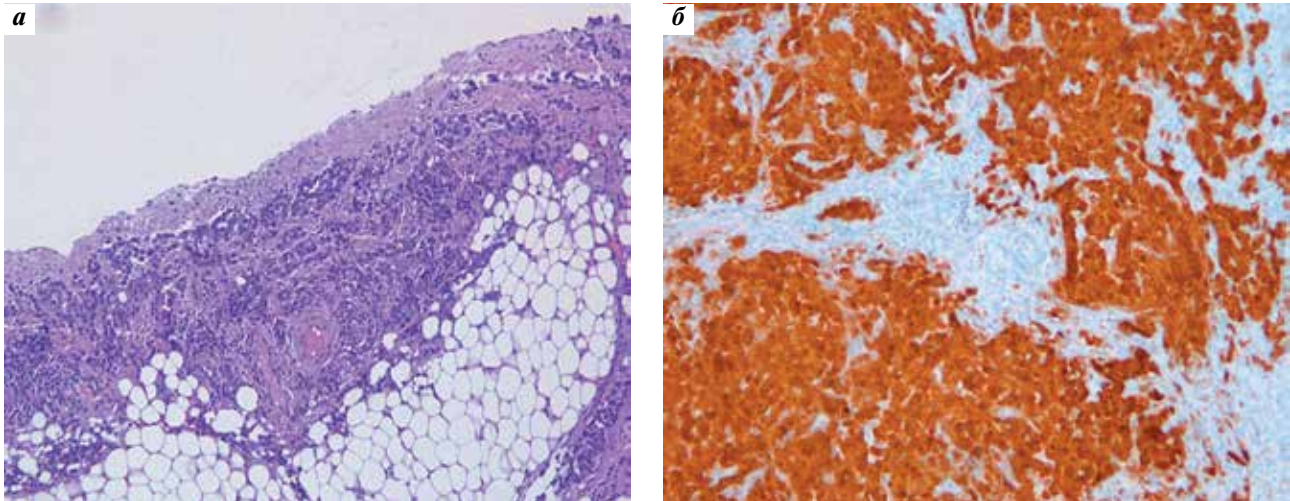


Рис. 2. Морфологическое исследование новообразования брюшины: а – гистологический препарат злокачественной эпителиоидной мезотелиомы брюшины (окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$); б – иммуногистохимическое исследование: клетки опухоли диффузно экспрессируют кальретинин ($\times 100$)

Fig. 2. Morphological study of neoplasm of the peritoneum: a – histological preparation of malignant peritoneal epithelioid mesothelioma (stained with hematoxylin and eosin, $\times 100$); б – immunohistochemical study: tumor cells diffusely express calretinin ($\times 100$)

не встречающиеся в аденокарциномах пищеварительной системы.

Большинство клеток исследуемой опухоли экспрессировали СК5/6 и WT-1, тогда как лишь в части клеток наблюдалась экспрессия подоплатина; экспрессия кальретинина, кадгерина-17 и CDX-2 в клетках опухоли отсутствовала (рис. 2). По результатам иммуноморфологического исследования новообразования брюшины были классифицированы как тубуло-папиллярный вариант диффузной злокачественной эпителиоидной мезотелиомы брюшины (ВОЗ, 2020), прогностическая группа по классификации Cerutto – 2 [13].

Таким образом, пациентке был установлен клинический диагноз первично-множественных злокачественных опухолей: 1) рак тела желудка cT3N1M0, III стадия; 2) эпителиоидная мезотелиома брюшины.

Случай обсужден на мультидисциплинарном консилиуме с участием хирурга, химиотерапевта и радиолога. Принято решение о проведении предоперационной полихимиотерапии по схеме mFOLFOX (лейковорин, фторурацил, оксалиплатин) с последующей контрольной лапароскопией. С июля по декабрь 2021 г. пациентке проведено 8 курсов полихимиотерапии с умеренной токсичностью (парестезии), достигнута стабилизация, по данным ЭГДС и компьютерной томографии.

Повторная диагностическая лапароскопия (22.02.2022) выявила отсутствие динамики: множественные мелкие отсевы по брюшине сохранялись. Учитывая стабилизацию заболевания и удовлетворительный соматический статус пациентки, выполнена конверсия в срединную лапаротомию. Индекс кар-

циноматоза во время операции (peritoneal cancer index, Surg. PCI) – 9.

Проведена операция в объеме гастрэктомии, тотальной париетальной перитонэктомии, аппендэктомии (рис. 3–5). CCR (completeness of cytoreduction, остаточная опухоль) – 0; индекс карциноматоза (PCI) после операции – 0. От внутрибрюшной химиоперфузии с гипертермией решено воздержаться в связи с большим объемом операции и предшествующими 8 курсами полихимиотерапии.

При гистологическом исследовании операционного материала на слизистой желудка в области малой кривизны и задней стенки была обнаружена зона втяжения размерами $2,5 \times 2,5$ см, расположенная в 6,5 см от проксимального края резекции и 8 см от дистального края. На разрезе в области втяжения стенка желудка была истончена до 0,4 см и представлена белесоватой полупрозрачной тканью.

При микроскопическом исследовании в измененной части стенки желудка была обнаружена остаточная аденокарцинома (тип по Lauren – кишечный) с признаками лечебного патоморфоза G₃ (по Mandard), прораставшая в субсерозный слой и клетчатку малого сальника, с признаками периневральной инвазии при отсутствии сосудистой инвазии; края резекции – R0.

На поверхности удаленных фрагментов брюшины были обнаружены разнокалиберные очаги злокачественной эпителиоидной мезотелиомы.

В послеоперационном периоде у пациентки был выявлен тромбоз глубоких вен голеней (03.03.2022), в связи с чем был назначен эноксапарин натрия в лечебной дозе. По данным контрольного ультразвукового

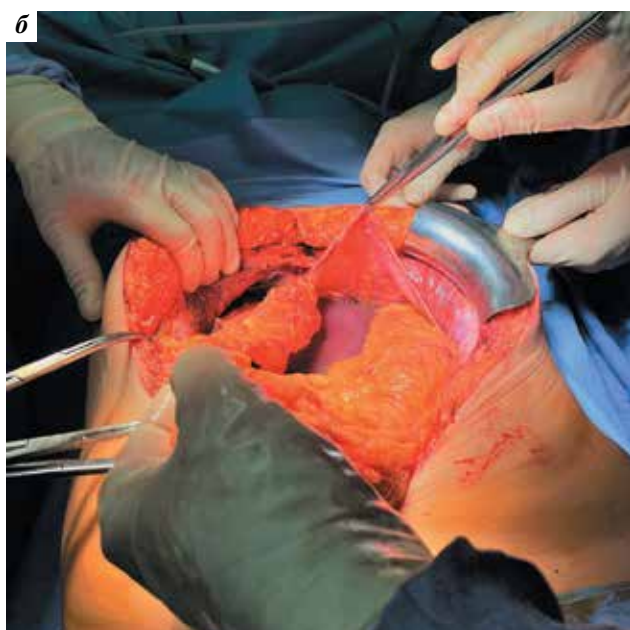


Рис. 3. Этапы перитонэктомии: а – левый купол диафрагмы; б – от краев раны

Fig. 3. Stages of peritonectomy: a – the left diaphragm; б – from the edges of the wounds

исследования вен нижних конечностей: положительная динамика, признаки реканализации тромботических масс. Пациентка выписана в удовлетворительном состоянии с рекомендациями.

При контрольном обследовании через год признаки прогрессирования не выявлены (рис. 6).

По данным ЭГДС (декабрь 2022): состояние после гастрэктомии, без визуальных признаков внутрипросветного рецидива.



Рис. 4. Перитонэктомия в малом тазу (удалена брюшина Дугласова кармана)

Fig. 4. Peritonectomy in the pelvis (removed the peritoneum of the Douglas)

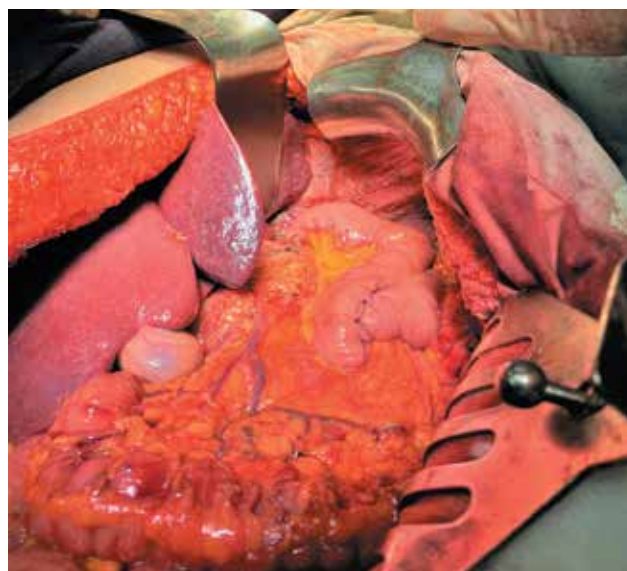


Рис. 5. Окончательный вид операционного поля, анастомозы

Fig. 5. The final view, anastomoses

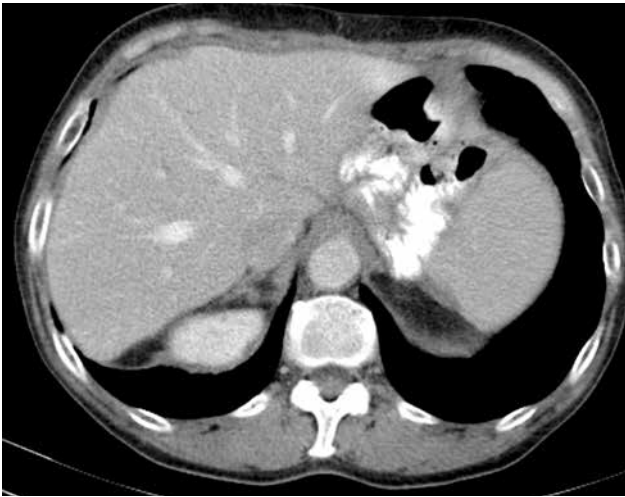


Рис. 6. Компьютерная томография через год после операции: без признаков прогрессирования
Fig. 6. Computed tomography scan one year after surgery: no signs of progression

Заключение

Мезотелиома брюшины является редким заболеванием с предполагаемой частотой 1 случай на 1 млн населения, при этом основная часть данных литературы посвящена мезотелиоме плевры, которая встречается в 3 раза чаще и обладает индивидуальными молекулярными и прогностическими факторами, следовательно, экстраполировать результаты лечения мезотелиомы плевры на другие локализации мезотелиом не совсем корректно. Представленное клиническое наблюдение демонстрирует еще более редкое сочета-

ние — аденокарцинома желудка и мезотелиома брюшины. Основополагающим моментом для определения тактики лечения в данном случае является правильная интерпретация морфологической картины, так как внешние признаки карциноматоза соответствовали интраперитонеальной диссеминации РЖ. На основании правильно установленного диагноза пациентке была проведена неоадьювантная химиотерапия с последующим хирургическим лечением. Пациентка находится в удовлетворительном состоянии, без признаков прогрессирования заболевания в течение года.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2020 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. 239 с. The state of oncological care for the population of Russia in 2020. Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, A.O. Shakhzadova. Moscow: MNI OI im. P.A. Gertsena — filial FGBU "NMITS radiologii", 2021. 239 p. (In Russ.).
2. Petrovich I., Ford J.M. Genetic predisposition to gastric cancer. *Semin Oncol* 2016;43(5):554–9. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2016.08.006
3. Van der Post R.S., Vogelaar I.P., Carneiro F. et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. *J Med Genet* 2015;52(6):361–74. DOI: 10.1136/jmedgenet-2015-103094
4. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Gastric Cancer, Version 2.2022. Available at: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/gastric.pdf/
5. Vimercati L., Cavone D., Delfino M. et al. Primary ovarian mesothelioma: a case series with electron microscopy examination and review of the literature. *Cancers* 2021;13(9):2278. DOI: 10.3390/cancers13092278
6. Vimercati L., Cavone D., Delfino M.C. et al. Asbestos exposure and malignant mesothelioma of the tunica vaginalis testis: a systematic review and the experience of the Apulia (southern Italy) mesothelioma register. *Environ Health* 2019;18(1):1–24. DOI: 10.1186/s12940-019-0512-4
7. Serio G., Pagliarulo V., Marzullo A. et al. Molecular changes of malignant mesothelioma in the testis and their impact on prognosis: analyses of two cases. *Int J Clin Exp Pathol* 2016;9(7):7658–67.
8. Duteilh F. Prostate Cancer and Asbestos: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Perm J* 2020;24:19.086. DOI: 10.7812/TPP/19.086.
9. Hillerdal G., Lindholm C.-E. Laryngeal cancer and asbestos. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1980;42:233–41. DOI: 10.1159/000275497
10. Serio G., Pezzuto F., Fortarezza F. et al. Mesothelioma and colorectal cancer: report of four cases with synchronous and metachronous presentation. *Int J Mol Sci* 2022;23(5):2630. DOI: 10.3390/ijms23052630
11. Pass H.I., Vogelzang N.J., Carbone M. Malignant mesothelioma. *Advances in Pathogenesis, Diagnosis, and Translational Therapies*. Springer Science + Business Media, Inc., New York, NY, USA, 2005. 853 p.

12. Kang D.-M., Kim J.-E., Kim Y.-K. et al. Occupational burden of asbestos-related diseases in Korea, 1998–2013: asbestosis, mesothelioma, lung cancer, laryngeal cancer, and ovarian cancer. *J Korean Med Sci* 2018;33(35):e226. DOI: 10.3346/jkms. 2018.33.e226
13. Höhn A.K., Brambs C.E., Hiller G.G.R. et al. WHO classification of female genital tumours. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2021;81(10):1145–53. DOI: 10.1055/a-1545-4279

Вклад авторов

А.Г. Абдуллаев: написание текста рукописи, подготовка интраоперационных фотографий, обзор публикаций по теме статьи;

Н.А. Козлов: написание текста рукописи, подготовки микрофотографий;

И.С. Стилиди: написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи.

Author's contribution

A.G. Abdullaev: article writing, preparing of intraoperative photographs, reviewing publications on the topic of the article;

N.A. Kozlov: article writing, preparing photographs;

I.S. Stilidi: article writing, reviewing publications on the topic of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.Г. Абдуллаев / A.G. Abdullaev: <https://orcid.org/0000-0003-0104-9087>

Н.А. Козлов / N.A. Kozlov: <https://orcid.org/0000-0003-3852-3969>

И.С. Стилиди / I.S. Stilidi: <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 14.02.2023. Принята к публикации: 24.04.2023.

Article received: 14.02.2023. Accepted for publication: 24.04.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-2-41-52>

Количественное соотношение экспрессии мРНК генов рецепторов системы IGF/INS при множественной миеломе

С.С. Шушанов¹, Ю.Б. Черных², Т.А. Захарова¹, Н.П. Акентьева³

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

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

³ФГБУН Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН; Россия, 142432 Московская обл., Черноголовка, пр-кт Академика Семенова, 1

Контакты: Саин Сакенович Шушанов sainHershy@yandex.ru

Введение. Индивидуумы с повышенной экспрессией компонентов системы IGF/INS чаще подвержены риску возникновения различных злокачественных новообразований. А в случае, когда компоненты системы IGF/INS гиперэкспрессированы в опухолях, это неблагоприятно влияет на прогноз заболевания, в том числе ведет к снижению безрецидивной выживаемости. Характерной особенностью системы IGF/INS является способность одних и тех же лигандов связываться с разными рецепторами (перекрестные взаимодействия) и активировать разные сигнальные пути в клетке. Эта особенность системы требует комплексного подхода к изучению экспрессии ее компонентов, а именно – исследования количественного соотношения экспрессии отдельных компонентов. Полученный результат позволит определить возможные сочетания лиганд-рецепторных связей и в конечном счете будет иметь как прогностическое, так и оценочное значение в плане терапевтической мишени.

Цель исследования – установить количественное соотношение экспрессии мРНК генов рецепторов системы IGF/INS: *IR-A*, *IR-B*, *IGF-1R* и *IGF-2R* в линии лимфобластодных клеток IM9 и в трех линиях миеломных клеток – RPMI1640, RPMI8226, H929, а также выявить частоту экспрессии генов этих рецепторов в мононуклеарной фракции аспиратов костного мозга, полученных от леченых больных множественной миеломой.

Материалы и методы. В работе были использованы лимфобластодные клетки человека и 3 типа миеломных клеток человека, отличающиеся по степени дифференцировки, а также аспираты костного мозга, полученные от 19 леченых больных множественной миеломой III стадии. Экспрессию мРНК в клетках изучали методом количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени, а в образцах аспиратов костного мозга – методом полуколичественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Результаты. В ходе исследования мы обнаружили, что внутри каждой линии клеток экспрессия мРНК *IR-A* является преобладающей по сравнению с экспрессией мРНК *IR-B*. У больных множественной миеломой наблюдается высокая частота экспрессии мРНК *IR-A* по сравнению с мРНК *IR-B*. Минимальное соотношение мРНК *IGF-1R:IR-A* и *IGF-1R:IR-B* приходится на лимфобластодные клетки IM9, а для миеломных клеток эти соотношения высокие. Соотношение *IGF-2R:IR-A* максимально для лимфобластодных клеток IM9, а для миеломных клеток это соотношение в 3 и более раза меньше.

Заключение. На основании исследования количественного соотношения мРНК генов рецепторов мы утверждаем, что в миеломных клетках высока вероятность присутствия гомодимеров IGF-1R/IGF-1R и IR-A/IR-A и гетеродимера IGF-1R/IR-A. Эти данные имеют как прогностическое, так и оценочное значение, поскольку указанные комбинации рецепторов предполагают существенное усиление митогенного эффекта за счет активации тремя лигандами – IGF-1, IGF-2 и INS, что является неблагоприятным фактором, особенно в том случае, когда больному множественной миеломой с сопутствующим сахарным диабетом наряду с химиотерапией назначена инсулинотерапия. На основании полученных данных в качестве терапевтической мишени мы рекомендуем ингибировать одновременно и рецептор IGF-1R, и рецептор IR-A.

Ключевые слова: инсулиноподобные факторы роста, инсулин, множественная миелома, экспрессия мРНК

Для цитирования: Шушанов С.С., Черных Ю.Б., Захарова Т.А., Акентьева Н.П. Количественное соотношение экспрессии мРНК генов рецепторов системы IGF/INS при множественной миеломе. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(2):41–52. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-2-41-52

Quantitative ratio of mRNA expression of IGF/INS system receptors in multiple myeloma

Sain S. Shushanov¹, Yulia B. Chernykh², Tatiana A. Zakharova¹, Natalia P. Akentieva³

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

²M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute; 61/2 Shchepkin St., Moscow 129110, Russia;

³Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences; 1 Akademika Semenova Ave., Chernogolovka, Moscow region 142432, Russia

Contacts: Sain Sakenovich Shushanov sainHershly@yandex.ru

Background. Individuals with increased expression of components of the IGF/INS system, are more likely to develop various malignancies. And in the case when the components of the IGF/INS system are overexpressed in tumors, this adversely affects the prognosis of the disease, including leading to a decrease in relapse-free survival. A characteristic feature of the IGF/INS system is the ability of the same ligands to bind to different receptors and vice versa (cross interactions) and activate different signaling pathways in the cell. This feature of the system requires an integrated approach to the study of the expression of its components, namely, the study of the quantitative ratio of the expression of individual components. The result obtained will make it possible to determine possible combinations of ligand-receptor bonds and, ultimately, will have both prognostic and evaluative value: in terms of a therapeutic target.

Aim. To establish the quantitative ratio of mRNA expression of the IGF/INS system receptors: *IR-A*, *IR-B*, *IGF-1R*, and *IGF-2R* in the IM9 lymphoblastoid cell line and in three myeloma cell lines: RPMI1640, RPMI8226, H929, and to identify frequency of expression of these receptors in the mononuclear fraction of bone marrow aspirates obtained from treated patients with multiple myeloma.

Materials and methods. We used human lymphoblastoid cells and 3 types of human myeloma cells, differing in the degree of differentiation and, as well as bone marrow aspirates obtained from 19 treated patients with stage III multiple myeloma. Expression of mRNA in cells was studied by quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction and in bone marrow aspirate samples by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction.

Results. During the study, we found that within each cell line, the receptor *IR-A* is predominant compared to the receptor *IR-B*. Patients with MM have a high frequency of *IR-A* expression compared to *IR-B*. The minimum ratio of *IGF-1R:IR-A* and *IGF-1R:IR-B* mRNA is in IM9 lymphoblastoid cells, and for myeloma cells these ratios are high. The ratio of *IGF-2R:IR-A* is maximum for IM9 lymphoblastoid cells, and for myeloma cells this ratio is three or more times less.

Conclusion. Based on the study of the quantitative ratio of receptor mRNA, we state that in myeloma cells there is a high probability of the presence of IGF-1R/IGF-1R and IR-A/IR-A homodimers, and an IGF-1R/IR-A heterodimer. These data have both prognostic and evaluative value, since these combinations of receptors suggest a significant increase in the mitogenic effect due to activation by three ligands: IGF-1, IGF-2 and INS, which is an unfavorable factor, especially when a patient with multiple myeloma with concomitant Diabetes mellitus was prescribed insulin therapy along with chemotherapy. Based on our findings, we recommend simultaneously inhibiting both the IGF-1R receptor and the IR-A receptor as a therapeutic target.

Keywords: insulin-like growth factors, insulin, multiple myeloma, mRNA expression

For citation: Shushanov S.S., Chernykh Yu.B., Zakharova T.A., Akentieva N.P. Quantitative ratio of mRNA expression of IGF/INS system receptors in multiple myeloma. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2023;22(2):41–52. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-2-41-52

Введение

Система инсулиноподобных факторов роста и инсулина (IGF/INS) включает инсулиноподобные факторы роста 1-го (IGF-1) и 2-го (IGF-2) типов, инсулин (INS), 6 типов IGF-связывающих белков (IGFBP1–IGFBP6), а также рецепторы IR-A, IR-B, IGF-1R, IGF-2R и их гибридные комбинации IR-A/IR-B, IGF-1R/IR-A и IGF-1R/IR-B [1–3]. Эта система важна для нормального (пренатального и постнатального) развития, клеточного метаболизма, пролиферации и выживания клеток, а также вовлечена в развитие различных типов злокачественных новообразо-

ваний [1]. INS с высокой аффинностью связывается с рецепторами IR-A и IR-B, с меньшей аффинностью – с рецептором IGF-1R и не связывается с гибридными рецепторами IGF-1R/IR-A и IGF-1R/IR-B. IGF-1 связывается с высокой аффинностью с IGF-1R, гибридными рецепторами IGF-1R/IR-A и IGF-1R/IR-B и имеет низкое сродство к рецепторам IR-A и IR-B. IGF-2 связывается с рецепторами IGF-1R, IR-A и с гибридным рецептором IGF-1R/IR-A. Фосфорилирование рецептора IGF-1R и гибридного рецептора IGF-1R/IR-A при связывании с IGF-1 или IGF-2 преимущественно активирует митогенные

сигналы. Фосфорилирование IR-A при связывании с INS или IGF-2 также приводит к активации митогенного сигналинга. Активация IR-B при взаимодействии с INS и активация гибридного рецептора IGF-1R/IR-B при связывании с IGF-1 в основном приводят к активации сигнальных путей, регулирующих метаболизм [2, 3]. Таким образом, характерной особенностью системы IGF/INS является способность одних и тех же лигандов связываться с разными рецепторами (перекрестные взаимодействия) и активировать различные сигнальные пути.

Установлено, что индивидуумы с повышенной экспрессией компонентов системы IGF/INS чаще подвержены риску возникновения различных злокачественных новообразований, а в случае, когда компоненты системы IGF/INS гиперэкспрессированы в уже возникших опухолях, это неблагоприятно влияет на прогноз заболевания, в том числе ведет к снижению безрецидивной выживаемости [1, 3, 4]. Поэтому исследование экспрессии генов системы IGF/INS в опухолях имеет как прогностическое, так и оценочное значение с точки зрения определения терапевтической мишени.

Еще одной характерной особенностью системы IGF/INS является способность подвергаться диверсификации сигналов с помощью различных механизмов. Например, клинические исследования ингибирования IGF-1R специфическими ингибиторами и моноклональными антителами привели к неожиданному результату: в ответ на ингибирование IGF-1R активировался IR-зависимый сигнальный путь, что стало причиной возникновения резистентности к IGF-1R-таргетной терапии. Также было установлено, что чувствительность к ингибированию IGF-1R зависит от соотношения экспрессии IGF-1R и IR. Если соотношение IGF-1R:IR высокое, как в случае с клетками рака молочной железы, ингибирование IGF-1R является эффективным, и, напротив, если соотношение IGF-1R:IR низкое, ингибирование IGF-1R не достигает результата [5–8]. Таким образом, прежде чем использовать в качестве терапевтической мишени тот или иной компонент системы IGF/INS, важно знать количественное соотношение экспрессии всех рецепторов этой системы, что позволит правильно оценить возможные варианты диверсификации сигналов и подобрать наиболее адекватную схему ингибирования.

На сегодняшний день существует достаточно много работ, посвященных исследованию экспрессии отдельных компонентов системы IGF/INS в опухолях человека. В частности, исследована частота экспрессии мРНК некоторых компонентов системы IGF/INS в нейроэндокринных опухолях [9], при легочном лимфангиолейомиоматозе [10], колоректальном раке [11, 12], саркоме Юинга [13] и целом ряде других

опухолей [14–19]. Часть из этих работ проведена в 2019–2022 гг., что свидетельствует о важности системы IGF/INS в онкологии и актуальности данного направления на сегодняшний день.

Множественная миелома (ММ) – злокачественное лимфопролиферативное заболевание, характеризующееся инфильтрацией костного мозга плазматическими клетками, наличием моноклонального иммуноглобулина в сыворотке крови и/или моче и остеолитическими поражениями костей. ММ относится к периферическим В-клеточным лимфоидным опухолям, на ее долю приходится 1 % всех онкологических заболеваний и 13 % всех гемобластозов [2, 20]. Данные литературы свидетельствуют о том, что система IGF/INS играет ключевую роль в патогенезе ММ и выполняет множественные функции в прогрессии ММ: усиливает пролиферацию и выживание миеломных клеток, участвует в селективной локализации клеток миеломы в костном мозге, остеоллизе, а также регулирует механизмы возникновения лекарственной устойчивости [2, 20]. Несмотря на большие успехи в терапии, ММ неизлечима, общая выживаемость составляет примерно 5,2 года после постановки диагноза в зависимости от возраста и терапии [20]. Хотя система IGF/INS играет ключевую роль в патогенезе ММ, терапевтическое воздействие на эту систему с использованием блокирующих антител или низкомолекулярных ингибиторов остается довольно ограниченным, и, учитывая многокомпонентность этой системы, требуется больше доклинических исследований [20].

Цель исследования – установить количественное соотношение экспрессии мРНК генов рецепторов системы IGF/INS: *IR-A*, *IR-B*, *IGF-1R* и *IGF-2R* в линии лимфобластоидных клеток IM9 и в трех линиях миеломных клеток – RPMI1640, RPMI8226, H929, а также выявить частоту экспрессии этих рецепторов в моноклеарной фракции аспиратов костного мозга, полученных от леченых больных ММ.

Полученные данные позволят установить присутствие наиболее характерных для ММ компонентов системы IGF/INS и выявить наиболее возможные и присущие ММ комбинационные взаимодействия между лигандами и рецепторами системы IGF/INS.

Материалы и методы

Линии клеток множественной миеломы. В работе были использованы 3 типа линий клеток ММ человека, отличающиеся по степени дифференцировки – RPMI8226, RPMI1640, H929, и лимфобластоидные клетки человека IM9. Происхождение миеломных клеток: человек, костный мозг, миелома. Происхождение клеток IM9: В-клетки, иммортализованные путем трансфекции вирусом Эпштейна–Барр. Способ культивирования – суспензионный в среде RPMI1640

с 10 % телячьей эмбриональной сывороткой при 37 °С, 5 % CO₂.

Клинический материал. В исследование были включены 19 пациентов в возрасте от 52 до 78 лет (10 мужчин и 9 женщин), у всех пациентов была диагностирована ММ III стадии. Диагноз ММ устанавливался на основании данных о плазмноклеточной инфильтрации костного мозга, иммунохимического исследования сыворотки крови и мочи, рентгенологических данных. Стадирование на момент диагностики проводили по общепринятой системе В.Г.М. Durie и С.Е. Salmon [21]. При иммунохимической характеристике патологического иммуноглобулина (PIg) установлено, что у 4 пациентов секретировался PIg Gκ, у 3 пациентов – PIg Gλ, у 5 пациентов – PIg Bκ, у 1 пациента – PIg BJ/Аλ, у 5 пациентов – PIg Aκ и у 1 пациента была определена секреция PIg Mκ.

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

Полуколичественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Экспрессию мРНК исследуемых генов определяли полуколичественным методом ОТ-ПЦР. Реакционная смесь для синтеза кДНК содержала 2 мкг тотальной клеточной РНК, 4 мкл «случайных» праймеров (гексануклеотиды) («Литех», Россия), 2 мМ смеси dNTP (MBI Fermentas), 2–4 ед. ингибитора РНКаз (MBI Fermentas), 100 ед. обратной транскриптазы М–MuLV (MBI Fermentas). Объем смеси составлял 25 мкл. Синтез кДНК с матрицы РНК проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) со следующими параметрами: обратная транскрипция – 42 °С, 50 мин; денатурация – 94 °С, 5 с. Для наработки продуктов ПЦР составляли реакционную смесь, содержащую 1 мкл раствора кДНК; 20 пкмоль каждого из праймеров; 2 мМ смеси dNTP (MBI Fermentas); 2,5 мкл 10-кратного буфера с (NH₄)₂SO₄ (MBI Fermentas), 25 мМ MgCl₂; 1 ед. Taq-ДНК-полимеразы; H₂O до конечного объема 25 мкл; минеральное масло – 30 мкл. Нуклеотидные последовательности использованных специфических праймеров приведены в табл. 1.

Реакцию амплификации проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) по следующей схеме: денатурация – 94 °С, 10 с; аннилинг – T_m, 10 с; синтез – 72 °С, 20 с. Наименование исследуемых генов, нуклеотидные последовательности праймеров и размеры ПЦР-продуктов приведены в табл. 1 и 2. В качестве внутреннего контроля для оценки количества взятой в реакцию РНК определяли экспрессию референсного гена глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (*GAPDH*). Продукты реакции ОТ-ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Размеры фрагментов оценивали в соответствии с расположением полос маркерной ДНК. Гель фотографировали при ультрафиолетовом

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для полуколичественной ОТ-ПЦР и размер ПЦР-продукта
Table 1. Nucleotide sequences of primers used for semi-quantitative RT-PCR and PCR product size

Ген Gene	Последовательность прямого (F)/обратного (R) праймеров (5'-3') Forward (F)/Reverse (R) primer sequence (5'-3')	Размер продукта, п. о. Product size, b. p.
<i>IR-A</i>	F: AACCAGAGTGAGTATGAGGAT R: CCGTTCCAGAGCGAAGTGCTT	600
<i>IR-B</i>	F: AACCAGAGTGAGTATGAGGAT R: CCGTTCCAGAGCGAAGTGCTT	636
<i>IGF-1R</i>	F: ATTGAGGAGGTCACAGAGAAC R: TTCATATCCTGTTTGGCCTG	755
<i>GAPDH</i>	F: CCCCTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTT R: GGCCATGAGGTCACCACCCTGTTGCTGTA	513

Примечание. ПЦР – полимеразная цепная реакция; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.
Note. PCR – polymerase chain reaction; RT-PCR – polymerase chain reaction with reverse transcription.

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для количественной ПЦР в реальном времени и размер ПЦР-продукта

Table 2. Nucleotide sequences of primers used for quantitative real-time PCR and size of the PCR product

Ген Gene	Последовательность прямого (F)/обратного (R) праймеров (5'-3') Forward (F)/Reverse (R) primer sequence (5'-3')	Размер продукта, п. о. Product size, b. p.
<i>IR-A</i>	F: TTTTCGTCCTCCAGGCCATC R: GTCACATTCCCAACATCGCC	58
<i>IR-B</i>	F: CCCCAGAAAAACCTCTTCAGG R: GTCACATTCCCAACATCGCC	87
<i>IGF-1R</i>	F: GGCACAATTACTGCTCCAAAGAC R: CAAGGCCCTTTCTCCCCAC	121
<i>IGF-2R</i>	F: GAGGGAAGAGGCAGGAAAG R: TGTGGCAGGCATACTCAG	164
<i>β-Actin</i>	F: AGCCATGTACGTTGCTATCCA R: ACCGGAGTCCATCACGATG	79

Примечание. ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Note. PCR – polymerase chain reaction.

возбуждении с помощью цифровой камеры Samsung CCTV LENZ.

Количественная ПЦР в реальном времени. Определение экспрессии мРНК генов *IR-A*, *IR-B*, *IGF-1R*, *IGF-2R* в линиях клеток проводили с помощью ПЦР в реальном времени на приборе CFX 96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad, США). Использовали набор реагентов для количественной ПЦР Cat# R-412 («НПФ Синтол», Россия). Смесь для ПЦР состояла из dNTP, 10 × ПЦР-буфера, ДНК-полимеразы *SynTaq*, $MgCl_2$, красителя SYBR Green, 10 пмоль прямого и обратного праймеров, кДНК образцов и ddH₂O в общем объеме 20 мкл. Условия циклирования были следующими: 95 °C в течение 5 мин и 40 циклов при 95 °C в течение 15 с, затем 60 °C в течение 25 с и 72 °C в течение 25 с. В этих условиях амплификацию не наблюдали в контрольных образцах без матрицы или без обратной транскрипции. Специфичность продукта амплификации определяли путем анализа кривой плавления для каждой пары праймеров. Данные были проанализированы с помощью сравнительного метода CT, а кратность изменения была рассчитана с помощью метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Для нормализации эффективности синтеза кДНК использовали амплификацию референсного гена β-актина. Все образцы анализировали в трех повторах и использовали средние значения экспрессии. Используемые последовательности олигонуклеотидных праймеров и размеры ПЦР-продуктов (пары оснований) отражены в табл. 2.

Статистическая обработка данных. Достоверность различий определяли с использованием U-критерия Манна–Уитни (непараметрического критерия). Различия в уровне экспрессии генов считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Мы исследовали количественное соотношение экспрессии мРНК генов рецепторов системы IGF/INS: *IR-A*, *IR-B*, *IGF-1R* и *IGF-2R* в 3 линиях миеломных клеток (RPMI1640, RPMI8226, H929) и в 1 линии лимфобластоидных клеток IM9. Полученные значения экспрессии мРНК исследуемых генов были нормализованы относительно значения экспрессии *IR-A*.

Количественное соотношение *IR-B:IR-A*. Наши исследования показали, что во всех линиях клеток экспрессия изоформы *IR-A* превалирует над экспрессией изоформы *IR-B*: в клетках RPMI1640 соотношение *IR-B:IR-A* составляет 0,1, в клетках RPMI8226 – 0,15, в клетках H929 – 0,035 и в клетках IM9 – 0,014 (табл. 3, рис. 1).

Таблица 3. Количественное соотношение *IR-B:IR-A*Table 3. Quantitative ratio of *IR-B:IR-A*

Ген Gene	IM9 $2^{-\Delta\Delta Ct}$	RPMI1640 $2^{-\Delta\Delta Ct}$	RPMI8226 $2^{-\Delta\Delta Ct}$	H929 $2^{-\Delta\Delta Ct}$
<i>IR-A</i>	1	1	1	1
<i>IR-B</i>	0,014	0,1	0,15	0,035

На основании сравнения ΔCt между линиями клеток мы отмечаем, что наименьшая экспрессия мРНК изоформы *IR-A* характерна для иммортализованных В-клеток IM9 ($\Delta Ct = 16,9$), а в миеломных клетках экспрессия *IR-A* выше (RPMI1640: $\Delta Ct = 10,94$; RPMI8226: $\Delta Ct = 12,86$; H929: $\Delta Ct = 9,52$). Экспрессия мРНК *IR-B* в клетках IM9 также ниже ($\Delta Ct = 21,7$),

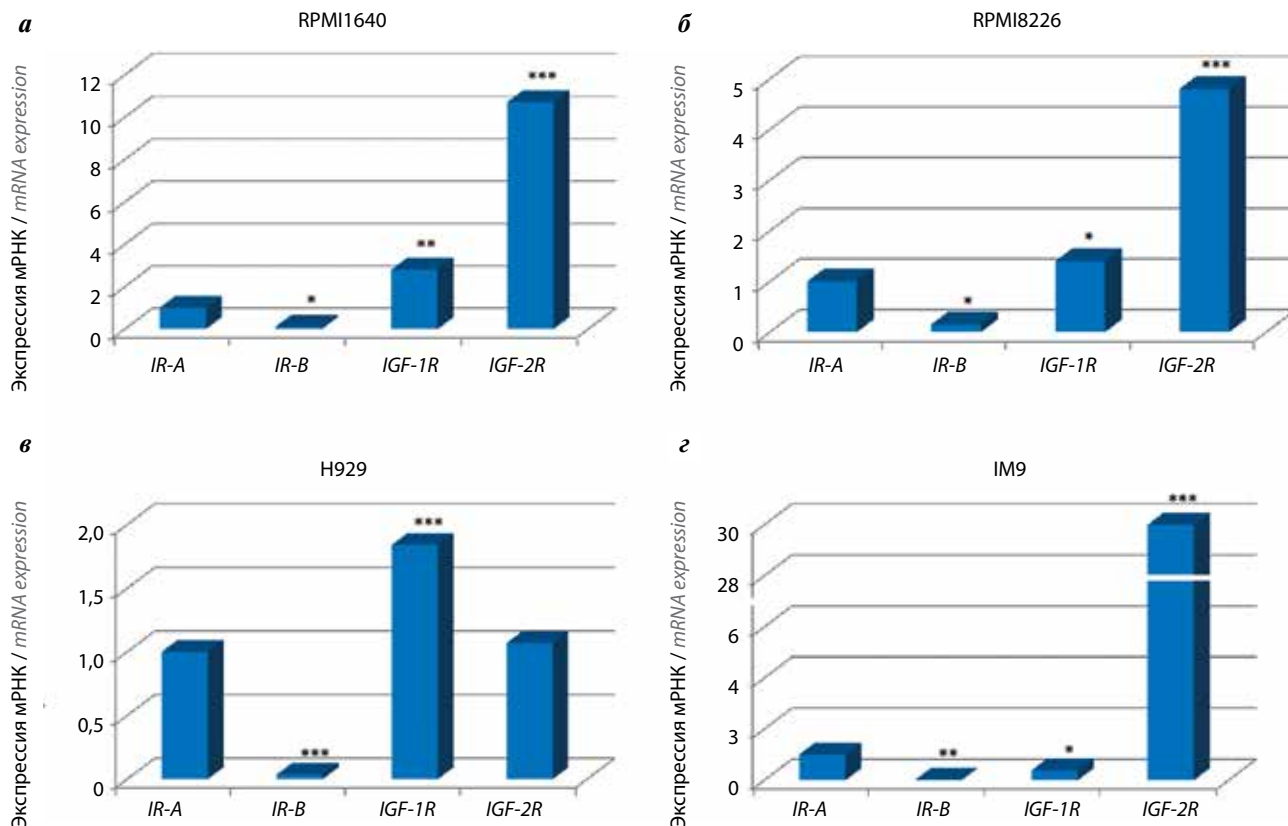


Рис. 1. Соотношения экспрессии мРНК генов рецепторов системы IGF/INS в клетках RPMI1640 (а), RPMI8226 (б), H929 (в) и IM9 (г). Приведены значения, нормализованные к IR-A. Статистически значимые различия по сравнению с IR-A: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$

Fig. 1. Expression ratios of mRNA of IGF/INS system receptors in RPMI1640 (a), RPMI8226 (б), H929 (в) и IM9 (г) cells. Values given are normalized to IR-A. Statistically significant differences compared to IR-A: * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$

чем в миеломных клетках (RPMI1640: $\Delta Ct = 13,7$; RPMI8226: $\Delta Ct = 14,1$; H929: $\Delta Ct = 14,35$).

Мы исследовали экспрессию мРНК IR-A и мРНК IR-B в аспиратах костного мозга, полученных от леченых больных, у которых была диагностирована ММ III стадии, и установили, что преимущественно экспрессируется мРНК IR-A (в 100 % случаев), а экспрессия мРНК IR-B наблюдается только у 32 % больных ММ (рис. 2).

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы, которые указывают на то, что во многих злокачественных новообразованиях преимущественно экспрессируется изоформа IR-A по сравнению с IR-B: при раке молочной железы, желудка [22], гепатокарциноме, раке предстательной железы, мочевого пузыря, эндометрия, яичников, щитовидной железы [23]. Механизмы, регулирующие экспрессию изоформ IR-A и IR-B, сложны и до конца не изучены. Известно, что активация изоформы IR-A опосредует митогенные эффекты, тогда как активация изоформы IR-B опосредует метаболические эффекты [2, 3].

Еще в 1994 г. в двух работах, вышедших с интервалом в 1 год, G.G. Freund и соавт. впервые показали,

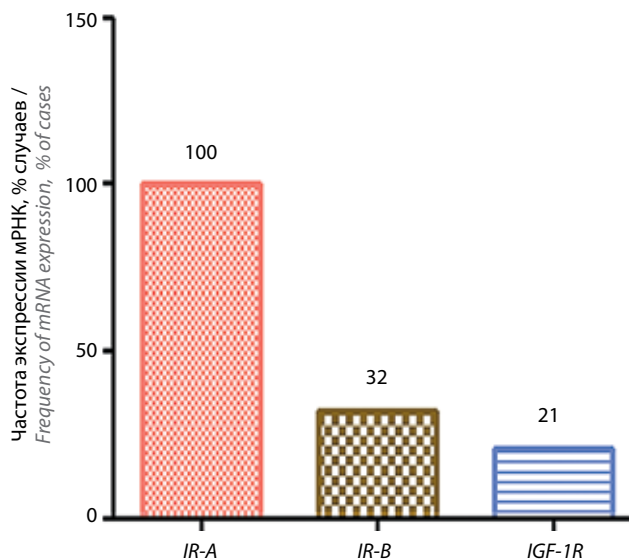


Рис. 2. Частота экспрессии мРНК генов рецепторов IR-A, IR-B и IGF-1R в мононуклеарной фракции клеток костного мозга, полученных от больных множественной миеломой (n = 19)

Fig. 2. Frequency of mRNA expression of receptors IR-A, IR-B and IGF-1R in the mononuclear fraction of bone marrow cells obtained from patients with multiple myeloma (n = 19)

что в клетках RPMI8226 INS усиливает митогенез и метаболизм глюкозы [24] и что IR (белок) экспрессируется преимущественно в миеломных линиях клеток U266 и RPMI8226 по сравнению с лимфобластоидными клетками (EBV, Ramos, HS Sultan) [25]. В настоящей работе мы показали, что в лимфобластоидных клетках IM9 обнаруживается низкая (по сравнению с миеломными клетками) экспрессия мРНК *IR-A* и *IR-B*, что коррелирует с экспрессией белка IR и согласуется с данными, полученными в упомянутой работе [25]. В 2010 г. А.С. Sprynski и соавт. показали, что рецептор IR является маркером плазматических клеток и не экспрессируется нормальными В-клетками памяти. Вместе с тем экспрессия IR индуцируется на 4-й день в ходе дифференцировки *in vitro* В-клеток памяти в активированные В-клетки, на 7-й день – в плазмобластах и на 10-й – в плазматических клетках. Рецептор IR также высоко экспрессируется нормальными плазматическими клетками в костном мозге. Таким образом, экспрессия рецептора IR возрастает в ходе нормальной дифференцировки плазматических клеток. Кроме того, в этой работе показано, что INS является значимым фактором роста для клеток миеломы [26]. Клетки IM9 – дифференцирующиеся (после стимуляции антигеном) формы антиген-наивного В-лимфоцита, и в ряду дифференцировки они находятся выше, чем плазмобласты. Тем не менее они экспрессируют и *IR-A*, и *IR-B*, и, возможно, что это результат их происхождения, т.е. клетки IM9 – это В-клетки, иммортализованные путем трансфекции вирусом Эпштейна–Барр.

Перечисленные выше работы коллег имеют obvious недостаток, который заключается в том, что они оценивали белок IR (суммарное количество белковых изоформ рецепторов *IR-A* и *IR-B*), и полученные данные не дают ответа на вопросы: как меняется экспрессия изоформ *IR-A* или *IR-B*, и в каком количественном соотношении они находятся в миеломных клетках. Дело в том, что на сегодняшний день не существует антител, которые различали бы рецепторы (белки) *IR-A* и *IR-B*. Эти изоформы отличаются всего лишь на 1 экзон (в гене рецептора *IR-A* отсутствует 11-й экзон), а используемые антитела определяют их суммарное количество [27]. Поэтому оценить экспрессию этих изоформ возможно только с помощью ПЦР в реальном времени с использованием праймеров, различающих мРНК *IR-A* и мРНК *IR-B* (см. табл. 1). В этом смысле настоящая работа имеет преимущество по сравнению с работами, в которых использовали антитела для исследования экспрессии суммарного количества обеих изоформ, которое в литературе обозначают как IR [24, 25].

Таким образом, мы исследовали экспрессию мРНК *IR-A* и мРНК *IR-B* в лимфобластоидных В-клетках IM9, трех линиях миеломных клеток (RPMI1640,

RPMI8226, H929) и в образцах, полученных от леченных больных ММ, и обнаружили, что во всех случаях изоформа *IR-A* является преобладающей по сравнению с изоформой *IR-B*. У больных ММ наблюдается высокая частота экспрессии *IR-A* по сравнению с *IR-B*. На основании сравнения ΔC_t мы заключаем, что наименьшая экспрессия мРНК и изоформы *IR-A*, и изоформы *IR-B* характерна для В-клеток IM9, тогда как во всех миеломных клетках экспрессия этих изоформ существенно выше. Ранее мы также показали, что INS является фактором роста для клеток RPMI1640, RPMI8226 и IM9 [28]. Учитывая то, что для миеломных клеток характерна высокая экспрессия мРНК гена рецептора *IR-A*, активация которого усиливает митогенный сигнал, можно предположить, что присутствие INS является неблагоприятным прогностическим фактором для пациентов с ММ, у которых сопутствующим заболеванием является сахарный диабет 2-го типа с присущей ему хронической гиперинсулинемией. Также при длительном лечении глюкокортикоидами у больных ММ часто возникает резистентность к INS и в последующем развивается сахарный диабет 2-го типа [29–32]. В таком случае инсулинотерапия, с одной стороны, и гиперэкспрессия *IR-A*, с другой, будут способствовать усилению митогенного ответа миеломных клеток на INS и IGF-2, который также взаимодействует и активирует *IR-A* и продуцируется локально как эпителиальными, так и стромальными клетками [2, 3]. Совокупность описанных событий, несомненно, будет усиливать пролиферацию миеломных клеток.

Известно, что изоформы IR представлены гомодимерами *IR-A/IR-A* и *IR-B/IR-B* и гетеродимером *IR-A/IR-B* (гибридный рецептор). Учитывая то, что во всех исследованных нами линиях клеток и в образцах от пациентов с ММ мРНК *IR-A*-изоформы является преобладающей по сравнению с мРНК *IR-B*-изоформы, мы можем утверждать, что вероятность присутствия гомодимера *IR-A/IR-A* при ММ является более высокой, чем присутствие *IR-A/IR-B* гибридного рецептора. Подтвердить это заключение на уровне белка невозможно из-за отсутствия антител, специфических для каждой изоформы IR. Что касается исследований количественного соотношения экспрессии *IR-A:IR-B* при ММ, таких данных в литературе мы не обнаружили, и данная работа, по-видимому, является одной из первых.

Количественное соотношение IGF-1R:IR-A и IGF-1R:IR-B. IGF-1R (белок) в клетках может присутствовать в виде гетеродимеров IGF-1R/IR-A и IGF-1R/IR-B. По этой причине мы исследовали соотношения и *IGF-1R:IR-A*, и *IGF-1R:IR-B*. Наши исследования показали, что во всех трех линиях миеломных клеток экспрессия мРНК *IGF-1R* превалирует над экспрессией мРНК изоформы *IR-A*: в клетках RPMI1640

соотношение *IGF-1R:IR-A* составляет 2,8, в клетках RPMI8226 – 1,4, в клетках H929 – 1,84, тогда как в лимфобластоидных клетках IM9 – 0,38 (табл. 4, см. рис. 1).

Таблица 4. Количественное соотношение *IGF-1R:IR-A*

Table 4. Quantitative ratio of *IGF-1R:IR-A*

Ген Gene	IM9 2 ^{-ΔCt}	RPMI1640 2 ^{-ΔCt}	RPMI8226 2 ^{-ΔCt}	H929 2 ^{-ΔCt}
<i>IR-A</i>	1	1	1	1
<i>IGF-1R</i>	0,38	2,8	1,4	1,84

В миеломных линиях клеток мРНК *IGF-1R* также превалирует над экспрессией мРНК изоформы *IR-B*: в клетках RPMI1640 соотношение мРНК *IGF-1R:IR-B* составляет 25,8, в клетках RPMI8226 – 9,25, в клетках H929 – 51,98, а в лимфобластоидных клетках IM9 отмечено незначительное преимущество мРНК *IGF-1* – 1,6 (табл. 5, см. рис. 1).

Таблица 5. Количественное соотношение *IGF-1R:IR-B*

Table 5. Quantitative ratio of *IGF-1R:IR-B*

Ген Gene	IM9 2 ^{-ΔCt}	RPMI1640 2 ^{-ΔCt}	RPMI8226 2 ^{-ΔCt}	H929 2 ^{-ΔCt}
<i>IR-B</i>	1	1	1	1
<i>IGF-1R</i>	1,6	25,8	9,25	51,98

Таким образом, минимальные количественные соотношения мРНК *IGF-1R:IR-A* (в 0,38 раза) и *IGF-1R:IR-B* (в 1,6 раза) приходится на лимфобластоидные клетки IM9, в которых экспрессия и *IR-A*, и *IR-B* слабее, чем в миелоидных клетках. Для миеломных клеток характерна повышенная экспрессия *IGF-1R* по сравнению с *IR-A* (в 2,8; 1,4; 1,84 раза), и существенно более высокая экспрессия *IGF-1R* по сравнению с *IR-B* (в 25,8; 9,25; 51,98 раза).

На основании сравнения ΔCt между линиями клеток мы отмечаем, что наименьшая экспрессия мРНК *IGF-1R* характерна для иммортализованных В-клеток IM9 (ΔCt = 21,03), а в миеломных клетках экспрессия мРНК *IGF-1R* выше (RPMI1640: ΔCt = 11,84; RPMI8226: ΔCt = 12,75; H929: ΔCt = 8,64).

Ранее было показано, что в клетках RPMI8226 *IGF-1* усиливает митогенез и метаболизм глюкозы [24] и что *IGF-1R* экспрессируется преимущественно в линиях миеломных клеток U266 и RPMI8226 по сравнению с лимфобластоидными клетками (EBV, Ramos, HS Sultan) [25]. Также показано, что *IGF-1* является выраженным фактором роста для миеломных клеток и что *IGF-1R* не экспрессируется нормальными В-клетками и плазматическими клетками, включая плазмо-

бласты. В то же время ген *IGF-1R* aberrантно экспрессируется в 31–50 % случаев у ранее не леченных пациентов с ММ [33]. R. Bataille и соавт. исследовали экспрессию белка *IGF-1R* в нормальных и малигнизированных плазматических клетках и обнаружили, что *IGF-1R* aberrантно экспрессируется в миеломных клетках человека. В этой работе была исследована экспрессия *IGF-1R* у 37 больных с впервые диагностированной ММ и показано, что экспрессия *IGF-1R* имеет плохое прогностическое значение [34]. W.G. Chng и соавт. исследовали экспрессию мРНК гена *IGF-1R* у 72 больных с впервые диагностированной ММ и отметили, что экспрессия *IGF-1R* увеличивалась в группе больных с плохим прогнозом [35]. Наши данные согласуются с данными перечисленных авторов: ранее мы также показали, что *IGF-1* является фактором роста для клеток RPMI1640, RPMI8226 и IM9 [36]. В данной нашей работе мы установили, что мРНК *IGF-1R* экспрессируется преимущественно в миеломных линиях клеток RPMI1640, RPMI8226, H9292 по сравнению с лимфобластоидными клетками IM9.

Мы также исследовали экспрессию мРНК *IGF-1R* в аспиратах костного мозга, полученных от 19 леченных больных, у которых была диагностирована ММ III стадии, и выявили, что мРНК *IGF-1R* экспрессируется у 21 % больных ММ (см. рис. 2). Если сравнить с данными А.С. Sprynski и соавт. [33], которые показали, что *IGF-1R* aberrантно экспрессируется в 31–50 % случаев у ранее не леченных пациентов с ММ, то в нашем случае показатель еще меньше – 21 % больных ММ. Возможно, что при лечении больных ММ часть клеток с положительной экспрессией *IGF-1R* погибает, и, таким образом, смещается соотношение клеток, экспрессирующих *IGF-1R*.

IGF-1R (белок) в клетках может присутствовать в виде гомодимера *IGF-1R/IGF-1R* и в виде гетеродимеров *IGF-1R/IR-A* и *IGF-1R/IR-B*. Оценить присутствие этих белковых комбинаций рецепторов можно только с помощью количественной ПЦР в реальном времени с использованием специфических праймеров (см. табл. 2). Благодаря полученным данным и с учетом того, что и мРНК рецептора *IGF-1R*, и мРНК рецептора *IR-A* во всех исследованных нами миеломных клетках являются преобладающими, мы можем утверждать, что высока вероятность присутствия гомодимера *IGF-1R/IGF-1R* и гетеродимера *IGF-1R/IR-A* и в гораздо меньшей степени – гетеродимера *IGF-1R/IR-B*. Как было сказано выше, и *IGF-1R/IGF1R*, и *IGF-1R/IR-A* с высокой аффинностью связываются с *IGF-1* и *IGF-2*, и последующее фосфорилирование рецепторов преимущественно активируют митогенные сигналы. Известно, что *IGF-1* экспрессируется клетками стромы (фибробластами), а также остеобластами и в высокой концентрации присутствует

в микроокружении костного мозга [2]. В этом случае IGF-1 паракринным образом стимулирует пролиферацию миеломных клеток в костном мозге. Мы исследовали и показали (неопубликованные данные), что сами миеломные клетки RPMI1640, RPMI8226 и H929 экспрессируют IGF-1, и в таком случае имеет место аутокринная стимуляция пролиферации миеломных клеток. Аутокринная стимуляция возможна и *in vivo*, о чем свидетельствует наша более ранняя работа. Мы исследовали экспрессию мРНК *IGF-1* в моноклеарной фракции клеток костного мозга, полученных от 26 леченых больных ММ, у которых была диагностирована ММ III стадии, и показали, что мРНК *IGF-1* экспрессируется в 19 случаях. При этом для пациентов с ММ, у которых наблюдался высокий уровень экспрессии *IGF-1*, характерно уменьшение показателя общей выживаемости, и, наоборот, при слабой экспрессии *IGF-1* или при ее отсутствии наблюдалось увеличение общей выживаемости [37].

Что касается INS, то классически считается, что он не связывается с гетеродимером IGF-1R/IR [3], тем не менее имеется работа, в которой доказывалось, что в миеломных клетках INS связывается и активирует IGF-1R/IR и тем самым усиливает рост клеток [26]. В таком случае присутствие в миеломных клетках гомодимера IGF-1R/IGF1R, гетеродимера IGF-1R/IR-A и гомодимера IR-A/IR-A предполагает существенное усиление митогенного эффекта за счет активации этих рецепторов тремя лигандами – IGF-1, IGF-2 и INS, что является неблагоприятным фактором. Это имеет как прогностическое, так и оценочное значение – в качестве терапевтической мишени необходимо ингибировать и IGF-1R, и IR-A. Если ингибировать только IGF-1R, тогда митогенный сигнал будет поступать через гомодимер IR-A/IR-A за счет активации лигандами IGF-2 и INS, что является особенно неблагоприятным для пациентов с ММ с сопутствующим сахарным диабетом, когда онкобольной принимает еще и INS. Как было сказано выше, у больных ММ часто возникает сахарный диабет, индуцированный цитостатиками, и при такой комбинации, когда, с одной стороны, миеломные клетки гиперэкспрессируют IR-A, а с другой – пациентам назначают INS, это, несомненно, будет активировать рост миеломных клеток и явно ухудшит прогноз лечения.

Количественное соотношение IGF-2R:IR-A. Наши исследования показали, что максимальное соотношение мРНК *IGF-2R:IR-A* характерно для лимфобластоидных клеток IM9–30,7, в то время как для миеломных клеток это соотношение в 3 и более раз меньше: в клетках RPMI1640 соотношение мРНК *IGF-2R:IR-A* составляет 10,7, в клетках RPMI8226 – 4,8, в клетках H929 – 1,07 (табл. 6, см. рис. 1).

На основании сравнения ΔCt между линиями клеток мы отмечаем, что наименьшая экспрессия мРНК

IGF-2R характерна для иммортализованных В-клеток IM9 ($\Delta Ct = 14,69$), а в миеломных клетках экспрессия мРНК *IGF-1R* существенно выше (RPMI1640: $\Delta Ct = 9,91$; RPMI8226: $\Delta Ct = 10,96$; H929: $\Delta Ct = 9,42$). Таким образом, полученные нами данные показывают, что для миеломных клеток характерен высокий уровень экспрессии мРНК *IGF-2R* по сравнению с лимфобластоидными клетками. Полученные данные, на первый взгляд, являются противоречивыми: с одной стороны, экспрессия *IGF-2R* в клетках IM9 очень высокая по отношению ко всем другим рецепторам (*IR-A*, *IR-B*, *IGF-1R*), а с другой – заметно более низкая по сравнению с экспрессией *IGF-2R* в миелоидных клетках. Известно, что рецептор IGF-2R (белок) не имеет тирозинкиназной активности и служит для удаления IGF-2 из экстраклеточного окружения путем связывания его на поверхности клетки [1]. То есть чем больше рецепторов IGF-2R на поверхности клеток, тем большее количество IGF-2 связывается и тем меньшее количество IGF-2 остается для активации IR-A и/или IGF-1R и проявляет митогенный эффект.

Таблица 6. Количественное соотношение IGF-2R:IR-A

Table 6. Quantitative ratio of IGF-2R:IR-A

Ген Gene	IM9 2 ^{-$\Delta\Delta Ct$}	RPMI1640 2 ^{-$\Delta\Delta Ct$}	RPMI8226 2 ^{-$\Delta\Delta Ct$}	H929 2 ^{-$\Delta\Delta Ct$}
<i>IR-A</i>	1	1	1	1
<i>IGF-2R</i>	30,7	10,7	4,8	1,07

Вместе с тем имеются данные, согласно которым IGF-2 при связывании с IGF-2R инициирует ERK1/2-сигналинг, регулирующий пролиферацию клеток [38]. На основании этих данных литературы мы предполагаем, что, поскольку в клетках IM9 наблюдается низкий уровень экспрессии как мРНК *IR-A*, так и мРНК *IGF-1R* и в то же время гиперэкспрессия мРНК *IGF-2R*, то в этом контексте возможно, что клеткам IM9 и не нужно чрезмерное воздействие IGF-2. И в этом случае высокая экспрессия IGF-2R позволяет связывать и блокировать IGF-2. В миеломных же клетках наблюдается более низкий, чем в IM9, уровень экспрессии мРНК *IGF-2R* относительно мРНК *IR-A*, однако экспрессия мРНК генов рецепторов *IR-A*, *IR-B*, *IGF-1R*, включая экспрессию *IGF-2R*, существенно выше, и в этом контексте возможно, что IGF-2/IGF-1R- и IGF-2/IR-A-сигналинг усиливает митогенный статус через активацию ERK1/2.

Во всех исследованных линиях клеток мРНК *IGF-2* экспрессируется очень слабо (неопубликованные данные). В аспиратах костного мозга, полученных от леченых больных, у которых была диагностирована

ММ III стадии, мРНК *IGF-2* экспрессировалась в разной степени в 13 из 23 образцов (неопубликованные данные). По-видимому, для миеломных клеток не характерна аутокринная стимуляция через активацию IGF-2/IGF-1R- и IGF-2/IR-A-сигналинга. В клиническом материале мы не исследовали экспрессию *IGF-2R*.

Заключение

Мы исследовали количественное соотношение экспрессии мРНК генов рецепторов системы IGF/INS: *IR-A*, *IR-B*, *IGF-1R* и *IGF-2R* в линии лимфобластоидных клеток IM9 и в трех линиях миеломных клеток – RPMI1640, RPMI8226, H929, а также определили частоту экспрессии этих рецепторов в мононуклеарной фракции аспиратов костного мозга, полученных от леченых больных ММ. В ходе исследования мы обнаружили, что внутри каждой линии клеток экспрессия мРНК рецептора *IR-A* является преобладающей по сравнению с экспрессией мРНК *IR-B*. У больных ММ наблюдается высокая частота экспрессии *IR-A* по сравнению с *IR-B*. Минимальное соотношение мРНК *IGF-1R:IR-A* и *IGF-1R:IR-B* характерно для лимфобластоидных клеток IM9 и мак-

симальное — для миеломных клеток. Соотношение *IGF-2R:IR-A* является максимальным для лимфобластоидных клеток IM9, а для миеломных клеток это соотношение в 3 и более раза меньше.

На основании исследования количественного соотношения мРНК рецепторов мы можем утверждать, что в миеломных клетках высока вероятность присутствия гомодимеров (белков) IGF-1R/IGF1R и IR-A/IR-A, а также гетеродимера IGF-1R/IR-A. Эти данные имеют как прогностическое, так и оценочное значение, поскольку указанные комбинации рецепторов предполагают существенное усиление митогенного эффекта за счет активации тремя лигандами – IGF-1, IGF-2 и INS, что является неблагоприятным прогностическим фактором.

На основании полученных данных в качестве терапевтической мишени мы рекомендуем ингибировать и рецептор IGF-1R, и рецептор IR-A. Ингибирование только рецептора IGF-1R не исключает митогенный сигнал, поступающий через гомодимер IR-A/IR-A за счет активации лигандами IGF-2 и INS, что является неблагоприятным фактором, особенно в том случае, когда больному ММ с сахарным диабетом наряду с химиотерапией назначена инсулинотерапия.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Fettig L.M., Yee D. Advances in insulin-like growth factor biology and-directed cancer therapeutics. *Adv Cancer Res* 2020;147:229–57. DOI: 10.1016/bs.acr.2020.04.005
- Шушанов С.С. Роль инсулиноподобного фактора роста I типа (IGF-1) и некоторых других членов системы IGF/инсулин в прогрессии множественной миеломы. *Российский биотерапевтический журнал* 2012;11(3):71–80. Shushanov S.S. The role of insulin-like growth factor I type (IGF-1) and some other members of the IGF/insulin system in the progression of multiple myeloma. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2012;11(3):71–80. (In Russ.).
- Gallagher E.J., LeRoith D. Minireview: IGF, insulin, and cancer. *Endocrinology* 2011;152(7):2546–51. DOI: 10.1210/en.2011-0231
- Wang C., Su K., Zhang Y. et al. IR-A/IGF-1R-mediated signals promote epithelial-mesenchymal transition of endometrial carcinoma cells by activating PI3K/AKT and ERK pathways. *Cancer Biol Ther* 2019;20(3):295–306. DOI: 10.1080/15384047.2018.1529096
- Ulanet D.B., Ludwig D.L., Kahn C.R., Hanahan D. Insulin receptor functionally enhances multistage tumor progression and conveys intrinsic resistance to IGF-1R targeted therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(24):10791–8. DOI: 10.1073/pnas.0914076107
- Dinchuk J.E., Cao C., Huang F. et al. Insulin receptor (IR) pathway hyperactivity in IGF-1R null cells and suppression of downstream growth signaling using the dual IGF-1R/IR inhibitor, BMS-754807. *Endocrinology* 2010;151(9):4123–32. DOI: 10.1210/en.2010-0032
- Zhang H., Pelzer A.M., Kiang D.T., Yee D. Down-regulation of type I insulin-like growth factor receptor increases sensitivity of breast cancer cells to insulin. *Cancer Res* 2007;67(1):391–7. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1712
- Burtrum D., Zhu Z., Lu D. et al. A fully human monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor blocks ligand-dependent signaling and inhibits human tumor growth *in vivo*. *Cancer Res* 2003;63(24):8912–21.
- Wulbrand U., Rimmert G., Zöfel P. et al. mRNA expression patterns of insulin-like growth factor system components in human neuroendocrine tumours. *Eur J Clin Invest* 2000;30(8):729–39. DOI: 10.1046/j.1365-2362.2000.00700.x
- Valencia J.C., Matsui K., Bondy C. et al. Distribution and mRNA expression of insulin-like growth factor system in pulmonary lymphangioleiomyomatosis. *J Investig Med* 2001;49(5):421–33. DOI: 10.2310/6650.2001.33787
- Yamamoto N., Oshima T., Yoshihara K. et al. Clinicopathological significance and impact on outcomes of the gene expression levels of *IGF-1*, *IGF-2* and *IGF-1R*, *IGFBP-3* in patients with colorectal cancer: overexpression of the *IGFBP-3* gene is an effective predictor of outcomes in patients with colorectal cancer. *Oncol Lett* 2017;13(5):3958–66. DOI: 10.3892/ol.2017.5936
- Kasprzak A. Insulin-like growth factor (IGF-1) signaling in glucose metabolism in colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 2021;22(12):6434. DOI: 10.3390/ijms22126434
- Scotlandi K., Manara M.C., Serra M. et al. Expression of insulin-like growth factor system components in Ewing's sarcoma and their association with survival. *Eur J Cancer* 2011;47(8):1258–66. DOI: 10.1016/j.ejca.2011.01.007

14. Catellani C., Ravegnini G., Sartori C. et al. GH and IGF system: the regulatory role of miRNAs and lncRNAs in cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12:701246. DOI: 10.3389/fendo.2021.701246
15. Mancarella C., Morrione A., Scotlandi K. et al. Novel regulators of the IGF system in cancer. *Biomolecules* 2021;11(2):273. DOI: 10.3390/biom11020273
16. Altieri B., Colao A., Faggiano A. et al. The role of insulin-like growth factor system in the adrenocortical tumors. *Minerva Endocrinol* 2019;44(1):43–57. DOI: 10.23736/S0391-1977.18.02882-1
17. Zheng Y., Sowers J.Y., Houston K.D. et al. IGF1BP-1 expression promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells *via* Erk pathway activation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:233. DOI: 10.3389/fendo.2020.00233
18. Nguyen T.N.Q., Jung S., Nguyen H.A. et al. The regulation of insulin receptor/insulin-like growth factor 1 receptor ratio, an important factor for breast cancer prognosis, by TRIP-Br1. *J Hematol Oncol* 2022;15(1):82. DOI: 10.1186/s13045-022-01303-6
19. Tirrò E., Massimino M., Romano C. et al. Prognostic and therapeutic roles of the insulin growth factor system in glioblastoma. *Front Oncol* 2021;10:612385. DOI: 10.3389/fonc.2020.612385
20. Bieghs L., Johnsen H.E., Maes K. et al. The insulin-like growth factor system in multiple myeloma: diagnostic and therapeutic potential. *Oncotarget* 2016;7(30):48732–52. DOI: 10.18632/oncotarget.8982
21. Durie B.G.M., Salmon S.E. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment and survival. *Cancer* 1975;36(3):842–54. DOI: 10.1002/1097-0142(197509)36:3<842::aid-cnrc2820360303>3.0.co;2-u
22. Heckl S.M., Wiesener V., Behrens H.-M. et al. The expression of the insulin receptor in gastric cancer correlates with the HER2 status and may have putative therapeutic implications. *Gastric Cancer* 2019;22(6):1130–42. DOI: 10.1007/s10120-019-00964-6
23. Vella V., Milluzzo A., Scalisi N.M. et al. Insulin receptor isoforms in cancer. *Int J Mol Sci* 2018;19(11):3615. DOI: 10.3390/ijms19113615
24. Freund G.G., Kulas D.T., Mooney R.A. Insulin and IGF-1 increase mitogenesis and glucose metabolism in the multiple myeloma cell line, RPM1 8226. *J Immunol* 1993;151(4):1811–20.
25. Freund G.G., Kulas D.T., Way B.A., Mooney R.A. Functional insulin and insulin-like growth factor-1 receptors are preferentially expressed in multiple myeloma cell lines as compared to B-lymphoblastoid cell lines. *Cancer Res* 1994;54(12):3179–85.
26. Sprynski A.C., Hose D., Kassambara A. et al. Insulin is a potent myeloma cell growth factor through insulin/IGF-1 hybrid receptor activation. *Leukemia* 2010;24(11):1940–50. DOI: 10.1038/leu.2010.192
27. Flannery C.A., Rowzee A.M., Choe G.H. et al. Development of a quantitative PCR assay for detection of human insulin-like growth factor receptor and insulin receptor isoforms. *Endocrinology* 2016;157(4):1702–8. DOI: 10.1210/en.2015-1698
28. Shushanov S.S., Kalinina A.A., Kravtsova T.A. et al. Dual effect exhibited by insulin in myeloma and lymphoblastoid cells. *Biointerf Res Appl Chem* 2021;12(3):2715–28. DOI: 10.33263/BRIAC123.27152728
29. Wu W., Merriman K., Nabaah A. et al. The association of diabetes and anti-diabetic medications with clinical outcomes in multiple myeloma. *Br J Cancer* 2014;111(3):628–36. DOI: 10.1038/bjc.2014.307
30. Zein N., Shehata M., Amer A.M. Carvone's hypoglycemic and hypolipidemic potent activity *via* regulation insulin-induced genes in diabetic hyperlipidemic rats. *Biointerf Res Appl Chem* 2023;13(3):206. DOI: 10.33263/BRIAC133.206
31. Altiti A.J., Khleifat K.M., Alqaraleh M. et al. Protective role of combined *Crataegus aronia* ethanol extract and phytosomes against hyperglycemia and hyperlipidemia in streptozotocin-induced diabetic rat. *Biointerf Res Appl Chem* 2023;13(3):207. DOI: 10.33263/BRIAC133.207
32. Gaur P.K., Pal H., Puri D. et al. Formulation and development of hesperidin loaded solid lipid nanoparticles for diabetes. *Biointerf Res Appl Chem* 2020;10(1):4728–33. DOI: 10.33263/BRIAC101.728733
33. Sprynski A.C., Hose D., Caillot L. et al. The role of IGF-1 as a major growth factor for myeloma cell lines and the prognostic relevance of the expression of its receptor. *Blood* 2009;113(19):4614–26. DOI: 10.1182/blood-2008-07-170464
34. Bataille R., Robillard N., Avet-Loiseau H. et al. CD221 (IGF-1R) is aberrantly expressed in multiple myeloma, in relation to disease severity. *Haematologica* 2005;90(5):706–7.
35. Chng W.J., Gualberto A., Fonseca R. IGF-1R is overexpressed in poor-prognostic subtypes of multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20(1):174–6. DOI: 10.1038/sj.leu.2403997
36. Шушанов С.С., Кравцова Т.А., Черных Ю.Б. Факторы, определяющие выживаемость клеток множественной миеломы человека *in vitro*. *Клиническая онкогематология* 2014;7(1):39–45. Shushanov S.S., Kravtsova T.A., Chernykh Yu.B. Factors determining the survival of human multiple myeloma cells *in vitro*. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2014;7(1):39–45. (In Russ.).
37. Шушанов С.С., Кравцова Т.А., Вайман А.В. и др. Гиперэкспрессия IGF-1 – неблагоприятный прогностический фактор при множественной миеломе. *Российский биотерапевтический журнал* 2019;18(1):42–9. DOI: 10.17650/1726-97840-2019-18-1-42-49 Shushanov S.S., Kravtsova T.A., Vayman A.V. et al. IGF-1 overexpression is an unfavorable prognostic factor in multiple myeloma. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2019;18(1):42–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-97840-2019-18-1-42-49
38. El-Shewy H.M., Lee Mi-H., Obeid L.M. et al. The insulin-like growth factor type I and insulin-like growth factor type 2/ mannose-6-phosphate receptors independently regulate ERK1/2 activity in HEK293 cells. *J Biol Chem* 2007;282(36):26150–7. DOI: 10.1074/jbc.M703276200

Вклад авторов

С.С. Шушанов, Н.П. Акентьева: разработка концепции и дизайна исследования, сбор, обработка, анализ и интерпретация данных, написание и редактирование текста рукописи;

Ю.Б. Черных: предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование рукописи;

Т.А. Захарова: сбор и обработка данных, редактирование рукописи.

Author's contributions

S.S. Shushanov, N.P. Akentieva: research concept and design, data collection and processing, data analysis and interpretation, article written and editing;

Y.B. Chernykh: provision of research materials, data analysis and interpretation, editing of the article;

T.A. Zakharova: data collection and processing, editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.С. Шушанов / S.S. Shushanov: <https://orcid.org/0000-0002-2273-3024>

Ю.Б. Черных / Yu.B. Chernykh: <https://orcid.org/0000-0002-7271-1560>

Т.А. Захарова / T.A. Zakharova: <https://orcid.org/0000-0001-7545-5876>

Н.П. Акентьева / N.P. Akentieva: <https://orcid.org/0000-0002-9126-3070>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках государственного задания (№ госрегистрации АААА-А19-119071890015-6 и № госрегистрации 2023-0015).

Funding. The study was carried out with financial support within the framework of the state assignment (state registration number АААА-А19-119071890015-6 and state registration number 2023-0015).

Статья поступила: 13.01.2023. Принята к публикации: 24.04.2023.

Article received: 13.01.2023. Accepted for publication: 24.04.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-2-53-59>

Взаимосвязь полиморфизмов генов белков-переносчиков *SLC01B1* и *ABCB1* с клиническими вариантами токсичности метотрексата при терапии острого лимфобластного лейкоза у детей

О.Д. Гурьева¹, М.И. Савельева², Ж.А. Созаева³, Т.Т. Валиев^{1,3}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 150000 Ярославль, ул. Революционная, 5;

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

Контакты: Оксана Дмитриевна Гурьева swimmer96ok@gmail.com

Введение. Несмотря на доказанную клиническую эффективность современных протоколов лечения острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей, высокие дозы метотрексата демонстрируют значительную межиндивидуальную вариабельность лекарственной токсичности и исходов заболевания. Такая вариабельность, вероятно, обусловлена полиморфизмами генов-транспортеров лекарственных средств и генов, ответственных за метаболизм цитостатиков, что делает фармакогенетические исследования все более актуальными.

Цель исследования – оценить ассоциативную связь генетических полиморфизмов *ABCB1* (C3435T rs1045642, rs1128503, rs2032582, rs4148738), *SLC01B1* T521C rs4149056 с основными видами токсичности метотрексата и наступлением клинического события (смерть, рецидив, прогрессия) при лечении ОЛЛ у детей.

Материалы и методы. В исследование включены 103 пациента с диагнозом ОЛЛ, получавшие терапию по протоколам немецкой группы BFM (2002/2009) с использованием высоких доз метотрексата (2000 и 5000 мг/м²). Для оценки нежелательных реакций применялись лабораторные методы с использованием шкалы токсичности NCI (CTCAE v5.0 2018 г.). Исследование полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLC01B1* выполнено с помощью метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Забор материала проводили однократно, независимо от сроков терапии метотрексатом. Для статистической обработки результатов использовали программу SPSS Statistics 21.0. Анализ ассоциаций выполнен с использованием критерия χ^2 и точного критерия Фишера.

Результаты. Развитие инфекционных осложнений, орофарингеального мукозита, задержки элиминации метотрексата значимо ассоциировано с полиморфизмами исследуемых генов – *SLC01B1* T521C rs4149056, *ABCB1* rs4148738 и *ABCB1* rs1128503 соответственно, что коррелирует с данными мировой научной литературы.

Заключение. Определение полиморфизмов генов, обеспечивающих транспорт и метаболизм метотрексата, является многообещающим и динамично развивающимся направлением клинической онкологии.

Ключевые слова: фармакогенетика, лекарственная токсичность, химиотерапия, острый лимфобластный лейкоз, дети

Для цитирования: Гурьева О.Д., Савельева М.И., Созаева Ж.А., Валиев Т.Т. Взаимосвязь полиморфизмов генов белков-переносчиков *SLC01B1* и *ABCB1* с клиническими вариантами токсичности метотрексата при терапии острого лимфобластного лейкоза у детей. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(2):53–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-2-53-59

Relationship of *SLC01B1* and *ABCB1* gene polymorphisms with clinical variants of methotrexate toxicity in pediatric acute lymphoblastic leukemia therapy

Oksana D. Gurieva¹, Marina I. Savelyeva², Zhanna A. Sozaeva³, Timur T. Valiev^{1,3}

¹*N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;*

²*Yaroslavl State Medical University, Ministry of Health of Russia; 5 Revolyutsionnaya St., Yaroslavl 150000, Russia;*

³*Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 2/1 Barrikadnaya St., Moscow 125993, Russia*

Contacts: Oksana Dmitrievna Gurieva swimmer96ok@gmail.com

Background. Despite the significant clinical efficacy of current treatment protocols for acute lymphoblastic leukemia (ALL) in children, high-dose methotrexate demonstrates significant interindividual variability in drug toxicity and disease outcomes due to polymorphisms of drug transporter genes and genes responsible for cytostatic metabolism, which makes pharmacogenetic studies increasingly relevant.

Aim. To evaluate the association of *ABCB1* (C3435T rs1045642, rs1128503, rs2032582, rs4148738), *SLC01B1* T521C rs4149056 gene polymorphisms with the main types of methotrexate toxicity and the onset of clinical events (death, recurrence, progression) during the treatment of childhood ALL.

Materials and methods. The study enrolled 103 patients diagnosed with ALL who received therapy according to BFM group protocols (2002/2009), using high-dose (2000 and 5000 mg/m²) methotrexate. Laboratory methods using NCI toxicity scales (CTCAE v5.0 2018) were used to assess adverse reactions. Real-time polymerase chain reaction method was used to study *ABCB1* and *SLC01B1* gene polymorphisms. The study material was peripheral blood. Material was sampled once, regardless of the duration of methotrexate therapy. SPSS Statistics 21.0 software was used for statistical processing of the results. Analysis of associations was performed using the χ^2 criterion and Fisher's exact test.

Results. Development of infectious complications, oropharyngeal mucositis, delayed MTX elimination, events were significantly associated with polymorphisms of the studied genes: *SLC01B1* T521C rs4149056, *ABCB1* rs4148738, *ABCB1* rs1128503, which correlates with the data of world scientific literature.

Conclusion. Determination of polymorphisms of genes responsible for the transport and metabolism of methotrexate is a promising and dynamically developing area of clinical oncology.

Keywords: pharmacogenetics, drug toxicity, chemotherapy, acute lymphoblastic leukemia, children

For citation: Gurieva O.D., Savelyeva M.I., Sozaeva Zh.A., Valiev T.T. Relationship of *SLC01B1* and *ABCB1* gene polymorphisms with clinical variants of methotrexate toxicity in pediatric acute lymphoblastic leukemia therapy. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2023;22(2):53–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-2-53-59

Введение

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) — один из наиболее распространенных гемобластозов у детей, на долю которого приходится около 30 % онкологических заболеваний в педиатрической популяции [1]. За последние несколько десятилетий благодаря использованию современных протоколов лечения значительно повысилась общая 5-летняя выживаемость, которая приблизилась к уровню 90 % [2, 3]. Однако результаты лечения детей, которым диагноз был поставлен в возрасте до 1 года, остаются без какой-либо динамики [4–6].

Метотрексат (methotrexate, MTX) — антиметаболит, широко используемый в терапии различных злокачественных заболеваний у детей, является важнейшим компонентом протоколов лечения ОЛЛ [7, 8]. MTX — антагонист фолата, конкурентно ингибирующий активность дигидрофолатдегидрогеназы (DHFR), вызывая истощение пуринов и тимидилата, что останавливает синтез ДНК и приводит к гибели клеток. Цитотоксический эффект MTX усиливается в быстро делящихся клетках, находящихся в митотической S-фазе. В связи с гиперактивацией *DHFR* в лейкоэмических бластных клетках, высокие дозы MTX (high-

dose methotrexate, HD-MTX) (>500 мг/м²) являются одной из терапевтических стратегий, используемых для насыщения DHFR и усиления цитотоксичности. Однако применение HD-MTX требует как терапевтического лекарственного мониторинга, так и специфической сопроводительной терапии [7, 9].

Фармакокинетика (ФК) MTX у младенцев может зависеть от разных факторов. MTX выводится главным образом через почки: исследования взрослой когорты пациентов показали, что приблизительно 70–90 % каждой дозы элиминируются из организма в неизменном виде с мочой [10]. Известно, что у младенцев наблюдаются как замедленное и частичное созревание почечных канальцев, так и переменная скорость гломерулярной фильтрации и почечного кровотока [8]. Поэтому элиминация MTX у детей младшего возраста может быть значительно замедлена по сравнению с детьми более старшего возраста.

Терапия MTX характеризуется значительной межличностной вариабельностью [5–7], повышенной токсичностью при медленном клиренсе [8, 9] и снижением эффективности при быстром клиренсе препарата [10]. Из-за значительного вклада энтерогепатической рециркуляции в утилизацию MTX

транспортные механизмы в почках и печени являются важными факторами, определяющими клиренс препарата [11]. В частности, к ним относятся транспортеры органических анионов растворенных веществ (organic anion transporters of the solute carrier family, OATPs), участвующие в утилизации различных субстратов, включая стероидные гормоны, противомикробные препараты, химиотерапевтические средства и статины [12]. Ген *SLCO1B1* имеет множество вариантов, меняющих его функцию. Однонуклеотидный полиморфизм *SLCO1B1*521T>C (SNP; rs4149056), присутствующий примерно у 15 % людей европеоидного или азиатского происхождения, приводит к нарушению переноса многих субстратов, что имеет важные клинические последствия. Так, например, при терапии статинами значительно более высокая частота миопатии встречается у пациентов с одним или несколькими аллелями варианта 521T>C из-за снижения печеночного поглощения, что приводит к увеличению системной экспозиции препарата [12, 13]. Несколько вариантов *SLCO1B1*, включая 521T>C, были показаны в геномных ассоциативных исследованиях как связанные с клиренсом МТХ у педиатрических пациентов с ОЛЛ [11, 14]. В этих исследованиях варианты *SLCO1B1* объясняли ~10 % (521T>C ~2 %) индивидуальной вариабельности клиренса МТХ [11].

Все существующие протоколы терапии ОЛЛ предполагают расчет дозы МТХ исходя из площади поверхности тела без учета влияния клинических или генетических факторов. Поскольку клиренс препарата имеет большое значение с точки зрения токсичности и исходов, точное дозирование HD-МТХ у каждого пациента для достижения целевых ФК-параметров позволит получить максимальные терапевтические эффекты при минимизации токсичности. Для создания алгоритмов дозирования препарата необходимы дополнительные данные о влиянии клинических и генетических факторов на клиренс HD-МТХ, особенно при наиболее часто используемой дозировке при лечении Т-линейного ОЛЛ – 5000 мг/м² [15, 16].

Вследствие комбинации химиотерапевтических препаратов в протоколах терапии ОЛЛ у детей отдельные однонуклеотидные полиморфизмы (single nucleotide polymorphisms, SNPs) вряд ли окажут существенное воздействие на ФК лекарств и частоту излечения. Однако они могут влиять на антилейкемические агенты, такие как 6-меркаптопурин или МТХ, за счет генов, воздействующих на семейство цитохрома P450 или глутатион S-трансферазы, и гена *ABCB1* [17].

Ген *ABCB1* (аденозинтрифосфатсвязывающая кассета подсемейства В, член 1), кодирующий аденозинтрифосфатзависимый насос для выведения лекарств, также называемый геном множественной

лекарственной устойчивости, экспрессируется в клетках печени, почках и желудочно-кишечном тракте [18]. Было показано, что полиморфизмы гена *ABCB1* изменяют экспрессию и/или функцию мембранного транспортера Р-гликопротеина (P-glycoprotein, P-gp) [19]. Гиперэкспрессия Р-gp в опухолевых клетках приводит к множественной лекарственной устойчивости, а ряд противолейкемических препаратов (например, глюкокортикостероиды, антрациклины и винкристин) являются субстратами для Р-gp. Несмотря на то что МТХ не считается субстратом Р-gp, исследования с участием пациентов, получавших монотерапию МТХ, показали, что полиморфизм *ABCB1*3435C4T может влиять на исход и токсичность терапии МТХ [18–20]. Исследования, изучающие клиническое влияние SNPs *ABCB1* ОЛЛ у детей, немногочисленны. В датском исследовании J. Gregers и соавт. обнаружено влияние SNPs *ABCB1*3435C4T на печеночную и гематологическую токсичность, также показано, что полиморфизмы данного гена влияют на эффлюкс (выведение) МТХ из лейкемических клеток [21]. Гематологическая токсичность III–IV степени (уровни гемоглобина <80 г/л, тромбоцитов <50 × 10⁹/л, нейтрофилов <1000/мл), наблюдавшаяся у пациентов с вариантом 3435TT после доксорубинсодержащей индукционной терапии, соответствует снижению риска рецидива [21]. Также в работе Y. Liu и соавт. была показана статистически значимая ассоциация между тяжелой нейтропенией (абсолютное количество нейтрофилов <500/мкл) и носительством вариантов аллелей *ABCB1* rs1045642 (отношение рисков 5,174; 95 % доверительный интервал 1,674–15,989) и *ABCB1* rs1128503 (отношение рисков 3,364; 95 % доверительный интервал 1,257–9,004) соответственно [22].

Для выявления возможных ассоциаций вариантов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* с токсичностью МТХ на этапе консолидации ремиссии и наступлением событий мы инициировали пилотное исследование в российской педиатрической популяции больных.

Цель исследования – оценить ассоциативную связь генетических полиморфизмов *ABCB1* (C3435T rs1045642, rs1128503, rs2032582, rs4148738), *SLCO1B1* T521C rs4149056 с основными видами токсичности МТХ и наступлением клинического события (смерть, рецидив, прогрессия) при лечении ОЛЛ у детей.

Материалы и методы

Проведен проспективный анализ базы данных пациентов детского возраста с ОЛЛ в рамках наблюдательного одноцентрового исследования.

Критерии включения. В исследование включали детей в возрасте от 7 мес до 18 лет с диагнозом ОЛЛ, получивших терапию препаратом МТХ в рекомендованных терапевтических дозировках (2000 и 5000 мг/м²) согласно протоколам ALL IC-BFM 2002/2009 на базе

Научно-исследовательского института детской онкологии и гематологии (НИИ ДОГ) ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Критерии исключения. Выраженная соматическая патология (печени, почек, сердечно-сосудистой и нервной систем), препятствующая проведению программной химиотерапии; психотическое состояние или тяжелое психическое заболевание в анамнезе (шизофрения, эпилепсия, биполярное расстройство и т. п.), способные повлиять на согласие и возможность больного участвовать в исследовании; одновременный прием препаратов, влияющих на ФК и/или фармакодинамику МТХ (аспирин, пенициллины, пробеницид, тимидин, дазатиниб, иматиниб, омепразол).

Условия проведения. Поиск и набор участников исследования осуществлялись только среди пациентов, получавших терапию на базе НИИ ДОГ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Период включения пациентов в исследование — с 2016 по 2022 г.

Описание медицинского вмешательства. Для стратификации больных ОЛЛ на прогностические группы риска применены критерии протоколов ALL IC-BFM 2002/2009; доза МТХ зависела от прогностической группы риска (2000 или 5000 мг/м²). Для анализа побочных эффектов использована оценка состояния больного с помощью лабораторных методов (общий и биохимический анализы крови) с применением шкалы токсичности NCI (СТСАЕ v 5.0 2018 г.), так как она является наиболее адаптивным инструментом оценки постхимиотерапевтических токсических явлений. Исследование полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* выполняли с помощью метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Забор материала (периферическая венозная кровь) проводили однократно, независимо от сроков терапии МТХ. Шкала Наранжо для оценки побочных эффектов не использовалась в связи с тем, что оцениваемые токсические эффекты являются стандартными осложнениями химиотерапии, которые оцениваются во всем мире по шкале NCI.

Основной исход исследования. Истинная конечная точка исследования — установление силы ассоциативной связи фармакогенетики маркеров и нежелательных явлений III–IV степени (как наиболее клинически значимых), связанных с применением МТХ, которая рассчитывалась как доля пациентов с нежелательными явлениями от общего числа пациентов с определенным аллельным вариантом SNP, рассчитанным с помощью критерия χ^2 либо точного критерия Фишера.

Анализ в подгруппах. Были сформированы подгруппы пациентов в зависимости от степеней тяжести гепатотоксичности, гематологической токсичности, орофарингеального мукозита, инфекционных ослож-

нений. Степени тяжести токсичности были объединены — I–II степени и клинически значимые III–IV степени, а также выделены подгруппы в зависимости от наличия мутантных либо диких вариантов генов-кандидатов. Формирование подгрупп было необходимо, чтобы избежать значимых различий неравномерно распределенных в исследуемой популяции изучаемых параметров.

Этическая экспертиза. Протокол лечения ALL IC-BFM 2002 является клинической рекомендацией Минздрава России. Протокол ALL IC-BFM 2009 широко применяется в странах Европы, Азии и Латинской Америки, утвержден на заседании Ученого совета и Протокольного комитета НИИ ДОГ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Протокол анализа фармакогенетики параметров токсичности утвержден на заседании Ученого совета НИИ ДОГ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России 17.10.2021.

Статистический анализ. Размер выборки предварительно рассчитывали в соответствии с группой исторического контроля. Нулевая гипотеза: предполагаемая частота нежелательных реакций III–IV степени не ассоциирована с полиморфизмами генов *ABCB1* и *SLCO1B1*. Альтернативная гипотеза: предполагаемая частота нежелательных реакций III–IV степени ассоциирована с полиморфизмами генов *ABCB1* и *SLCO1B1*. Ошибка первого рода: $\alpha < 0,05$, ошибка второго рода: $\beta = 0,2$.

Для переменных, отражающих различные признаки, использовали методы описательной статистики. Для анализа ассоциаций применяли критерии χ^2 Пирсона, точный критерий Фишера, различия считали значимыми при $p < 0,05$, сила взаимосвязи оценена с помощью критерия V Крамера. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics 21.0.

Результаты

Исследованы образцы периферической крови 103 пациентов: соотношение пациентов мужского ($n = 57$) и женского ($n = 46$) пола составило 1,2/1. Возрастные группы больных: <1 года — 2 (1,9 %) пациента, 1–3 года — 12 (11,7 %), 4–5 лет — 31 (30,1 %), 6–12 лет — 33 (32 %), 13–18 лет — 25 (24,3 %). Преобладал В-линейный иммуноподвариант ОЛЛ — 68 (66 %) случаев, Т-линейный вариант — 35 (34 %) случаев. Из всех пациентов 51 (49,5 %) пациент получал терапию согласно группе среднего риска, 43 (41,7 %) — согласно группе высокого риска, 9 (8,7 %) — стандартного риска по протоколу ALL IC-BFM 2002/2009.

По частоте полиморфизмов гена *SLCO1B1* T521C rs4149056 в исследуемой популяции чаще встречался TT (дикий вариант) — 76 (73,8 %) случаев, остальные варианты составили: CC — 3 (2,9 %) и TC — 24 (23,3 %) случая.

По частоте полиморфизмов гена *ABCB1* C3435T rs1045642 преобладал вариант TC – 42 (40,8 %) случая, остальные составили: TT – 33 (32 %) и CC (дикий) – 28 (27,2 %) случаев. Из полиморфизмов rs1128503 преобладал CC (дикий) – 40 (38,8 %) случаев, а варианты CT, TT и TC составили 37 (35,9 %), 25 (24,3 %) и 1 (1 %) соответственно. Среди полиморфизмов rs2032582 преобладал вариант GG (дикий) – 44 (42,7 %) случая, а варианты GT и TT составили 33 (32 %) и 26 (25,2 %) случаев соответственно. Полиморфизмы rs4148738 были представлены следующим образом: TT – 45 (43,7 %), CC – 28 (27 %), CT – 29 (28,3 %), TC – 1 (1 %).

Распределение по степени тяжести гепатотоксичности в исследуемой популяции было следующим: I–II степени – 52 (50,5 %) пациента, III–IV степени – 51 (49,5 %). Гематологическая токсичность I–II степени отмечена у 11 (10,7 %), III–IV степени – у 92 (89,3 %) пациентов. Орофарингеальный мукозит 0–II степени встречался у 47 (45,6 %) больных, III–IV степени – у 56 (54,4 %) больных. Инфекционные осложнения 0–II степени зарегистрированы у 70 (68 %) больных, III–V степени – у 33 (32 %). Нейротоксичность 0-й степени отмечена у 60 (58,3 %), I–II степени – у 33 (33 %), III–IV степени – у 8 (8,7 %) пациентов. Наступление события: смерть – 4 (3,9 %) пациента, рецидив – 20 (19,4 %), прогрессирование – 9 (8,7 %), анализируемые клинические события не наступили – 70 (68 %) пациентов. Нетоксичный уровень выведения МТХ на 42–54-й час отмечен у 56 (54,4 %) пациентов, задержка выведения (>54 ч) зафиксирована у 47 (45,6 %) пациентов.

Оценку токсичности проводили в постцитостатическом периоде, после полной элиминации HD-МТХ, а взаимосвязь с полиморфизмами указанных генов оценена с помощью таблиц сопряженности.

По результатам исследования обнаружено, что полиморфизм гена-кандидата *ABCB1* rs1128503 относительно сильно связан с наступлением события (смерть, рецидив, прогрессирование), так как точный критерий Фишера оказался равным 18,188 ($p = 0,025$), $\chi^2 = 0,445$, V Крамера – 0,257 ($p = 0,016$). Для *SLCO1B1* T521C rs4149056 и орофарингеального мукозита точный критерий Фишера составил 5,858 ($p = 0,039$), χ^2 и V Крамера – 0,247 ($p = 0,034$), что демонстрирует ассоциативную связь средней силы, также и с инфекционными осложнениями показана ассоциативная связь средней силы, так как точный критерий Фишера составил 7,552 ($p = 0,023$), χ^2 и V Крамера – 0,27 ($p = 0,021$).

При анализе в подгруппах генов-кандидатов выявлено, что мутантный полиморфизм гена *ABCB1* rs4148738 (CC дикий) значимо ассоциирован с задержкой выведения МТХ (≥ 54 ч), $\chi^2 = 11$ ($p = 0,012$).

Мутантный полиморфизм гена *ABCB1* rs2032582 (GG дикий) значимо ассоциирован с гепатотоксичностью, $\chi^2 = 4,314$ ($p = 0,038$).

Снижение клиренса МТХ и, следовательно, более выраженное воздействие МТХ на ткани потенциально ведет к повышенному риску МТХ-индуцированной токсичности, что требует назначения фолината кальция в более высоких дозах. Кроме того, снижение функции белков-транспортеров МТХ или ферментов фолатного пути может повышать внутриклеточную персистенцию МТХ, независимо от уровня в плазме, и, таким образом, приводить к повышению токсичности препарата, несмотря на его нормальный системный клиренс [22].

Обсуждение

По результатам проведенного исследования нулевая гипотеза была опровергнута, а альтернативная гипотеза частично подтверждена в контексте развития инфекционных осложнений и орофарингеального мукозита получением ассоциативных связей средней силы с носительством полиморфизма гена *SLCO1B1* T521C rs4149056, что согласуется с исследованиями L. B. Ramsey и соавт. [12, 15]. Однако в ходе исследования были получены другие, даже более значимые результаты, демонстрирующие наличие сильной ассоциативной связи наступления события с носительством полиморфизма гена *ABCB1* rs1128503, что имеет важное прогностическое значение для оценки выживаемости детей, страдающих ОЛЛ.

Выявленные достоверные ассоциации носительства мутантного полиморфизма гена *ABCB1* rs4148738 (CC дикий) с задержкой выведения МТХ (≥ 54 ч) объясняют необходимость точного дозирования МТХ у каждого пациента для достижения целевых ФК-параметров исходя из индивидуальных особенностей пациента, в том числе генетических, что согласуется с результатами исследований С. Rask и соавт. и T. S. Mikkelsen и соавт. [16, 17]. Кроме того, были обнаружены достоверные ассоциации носительства полиморфизма гена *ABCB1* rs2032582 (GG дикий) с гепатотоксичностью, что согласуется с исследованиями J. Gregers и соавт. [21].

Заключение

Таким образом, настоящее исследование подтверждает целесообразность дальнейшего изучения полиморфизмов генов, обеспечивающих транспорт и метаболизм МТХ, поскольку дополнительные генетические и клинические данные могут помочь врачам прогнозировать и своевременно профилактировать побочные эффекты терапии, профилировать риски токсичности МТХ и, возможно, оптимизировать как специфическую, так и сопроводительную терапию.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Howlader N., Noone A., Krapcho M. et al. SEER cancer statistics review, 1975–2014. National Cancer Institute, 2016. Available at: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/. Accessed 24 Apr. 2018.
- Шервашидзе М.А., Валиев Т.Т., Тупицын Н.Н. Перспективы оценки минимальной остаточной болезни в постиндукционном периоде при В-линейном остром лимфобластном лейкозе у детей. Российский журнал детской гематологии и онкологии (РЖДГО) 2020;7(2):15–22. DOI: 10.21682/2311-1267-2020-7-2-15-22
Shervashidze M.A., Valiev T.T., Tupitsyn N.N. Prospects for evaluation of the minimal residual disease in the post-induction period in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii = Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology 2020;7(2):15–22. (In Russ.) DOI: 10.21682/2311-1267-2020-7-2-15-22
- Terwilliger T., Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. Blood Cancer J 2017;7(6):e577. DOI: 10.1038/bcj.2017.53
- Inaba H., Greaves M., Mullighan C.G. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet 2013;381(9881):1943–55. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)62187-4
- Hilden J.M., Dinndorf P.A., Meerbaum S.O. et al. Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: report on CCG 1953 from the Children's Oncology Group. Blood 2006;108(2):441–51. DOI: 10.1182/blood-2005-07-3011
- Kotecha R.S., Gottardo N.G., Kees U.R., Cole C.H. The evolution of clinical trials for infant acute lymphoblastic leukemia. Blood Cancer J 2014;4(4):e200. DOI: 10.1038/bcj.2014.17
- Termuhlen A.M., Smith L.M., Perkins S.L. et al. Disseminated lymphoblastic lymphoma in children and adolescents: results of the COG A5971 trial: a report from the Children's Oncology Group. Br J Haematol 2013;162(6):792–801. DOI: 10.1111/bjh.12460
- Howard S.C., McCormick J., Pui C.H. et al. Preventing and managing toxicities of high-dose methotrexate. Oncologist 2016;21(12):1471–82. DOI: 10.1634/theoncologist.2015-0164
- Beechinor R.J., Thompson P.A., Hwang M.F. et al. The population pharmacokinetics of high-dose methotrexate in infants with acute lymphoblastic leukemia highlight the need for bedside individualized dose adjustment: a report from the Children's Oncology Group. Clin Pharmacokinet 2019;58(7):899–910. DOI: 10.1007/s40262-018-00734-0
- Lopez-Lopez E., Autry R.J., Smith C. et al. Pharmacogenomics of intracellular methotrexate polyglutamates in patients' leukemia cells *in vivo*. J Clin Invest 2020;130(12):6600–15. DOI: 10.1172/JCI140797
- Shen D.D., Azarnoff D.L. Clinical pharmacokinetics of methotrexate. Clin Pharmacokinet 1978;3(1):1–13. DOI: 10.2165/00003088-197803010-00001
- Ramsey L.B., Panetta J.C., Smith C. et al. Genome-wide study of methotrexate clearance replicates *SLCO1B1*. Blood 2013;121(6):898–904. DOI: 10.1182/blood-2012-08-452839
- Linskey D.W., English J.D., Perry D.A. et al. Association of *SLCO1B1* c.521T>C (rs4149056) with discontinuation of atorvastatin due to statin-associated muscle symptoms. Pharmacogenet Genomics 2020;30(9):208–11. DOI: 10.1097/FPC.0000000000000412
- Van de Steeg E., van Esch A., Wagenaar E. et al. Influence of human OATP1B1, OATP1B3, and OATP1A2 on the pharmacokinetics of methotrexate and paclitaxel in humanized transgenic mice. Clin Cancer Res 2013;19(4):821–32. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2080
- Ramsey L.B., Bruun G.H., Yang W. et al. Rare *versus* common variants in pharmacogenetics: *SLCO1B1* variation and methotrexate disposition. Genome Res 2012;22(1):1–8. DOI: 10.1101/gr.129668.111
- Rask C., Albertioni F., Bentzen S.M. et al. Clinical and pharmacokinetic risk factors for high-dose methotrexate-induced toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia – a logistic regression analysis. Acta Oncol 1998;37(3):277–84. DOI: 10.1080/028418698429586
- Mikkelsen T.S., Thorn C.F., Yang J.J. et al. PharmGKB summary: methotrexate pathway. Pharmacogenet Genomics 2011;21(10):679–86. DOI: 10.1097/FPC.0b013e328343dd93
- Borst L., Buchard A., Rosthøj S. et al. Gene dose effects of *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms on outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. J Pediatr Hematol Oncol 2012;34(1):38–42. DOI: 10.1097/MPH.0b013e3182346cdd
- Uhlén M., Fagerberg L., Hallström B.M. et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. Science 2015;347(6220):1260419. DOI: 10.1126/science.1260419
- Kato T., Hamada A., Mori S., Saito H. Genetic polymorphisms in metabolic and cellular transport pathway of methotrexate impact clinical outcome of methotrexate monotherapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. Drug Metab Pharmacokinet 2012;27(2):192–9. DOI: 10.2133/dmpk.dmpk-11-rg-066
- Gregers J., Gréen H., Christensen I.J. et al. Polymorphisms in the *ABCB1* gene and effect on outcome and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. Pharmacogenomics J 2015; 15(4):372–9. DOI: 10.1038/tpj.2014.81
- Liu Y., Yin Y., Sheng Q. et al. Association of *ABCC2* – 24C>T polymorphism with high-dose methotrexate plasma concentrations and toxicities in childhood acute lymphoblastic leukemia. PLoS One 2014;9(1):e82681 DOI: 10.1371/journal.pone.0082681

Вклад авторов

О.Д. Гурьева, Т.Т. Валиев, М.И. Савельева, Ж.А. Созаева: разработка концепции и дизайна исследования, сбор, обработка, анализ и интерпретация данных, написание и редактирование текста статьи.

Author's contributions

O.D. Gurieva, T.T. Valiev, M.I. Savelyeva, Zh.A. Sozaeva: concept and design of the study, data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation, article written and editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

О.Д. Гурьева / O.D. Gurieva: <https://orcid.org/0000-0002-0050-0721>

М.И. Савельева / M.I. Savelyeva: <http://orcid.org/0000-0002-2373-2250>

Ж.А. Созаева / Zh.A. Sozaeva: <https://orcid.org/0000-0001-5166-7903>

Т.Т. Валиев / T.T. Valiev: <https://orcid.org/0000-0002-1469-2365>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института детской онкологии и гематологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The study was approved by the Local Ethics Committee of the Research Institute of Pediatric Oncology and Hematology of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Минздрава России. Тематика государственного задания «Новые фармакогенетические маркеры безопасности фармакотерапии некоторых социально значимых заболеваний» (ЕГИСУ НИОКТР № 1022050400012-9).

Funding. This work was financially supported by the Ministry of Health of Russia. The subject of the state task “New pharmacogenetic markers of safety of pharmacotherapy for some socially significant diseases” (Uniform State Health Information System (USHIS) No. 1022050400012-9).

Статья поступила: 27.01.2023. Принята к публикации: 24.04.2023.

Article received: 27.01.2023. Accepted for publication: 24.04.2023.

Экспрессия $\beta 2$ -микροглобулина на злокачественных плазматических клетках множественной миеломы

Н.Н. Тупицын, Е.Э. Толстых

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Елена Эдуардовна Толстых elenatolstyk1@gmail.com

Введение. $\beta 2$ -микροглобулин – низкомолекулярный гликопротеин, который входит в состав главного комплекса гистосовместимости. Концентрация $\beta 2$ -микροглобулина в сыворотке крови больных увеличивается при различных онкогематологических патологиях, в том числе при множественной миеломе. Одним из методов обнаружения мембранного $\beta 2$ -микροглобулина является проточная цитофлуориметрия. В данной статье рассмотрена экспрессия $\beta 2$ -микροглобулина и ключевых маркеров на мембране злокачественных клеток у больных множественной миеломой в дебюте заболевания.

Цель исследования – изучение экспрессии $\beta 2$ -микροглобулина и маркеров CD45, CD56 и CD19 на мембране опухолевых плазматических клеток при первичной диагностике множественной миеломы.

Материалы и методы. Исследование экспрессии $\beta 2$ -микροглобулина и CD45, CD56 и CD19 проведено у 37 больных множественной миеломой методом 8-цветной проточной цитометрии с использованием панели моноклональных антител для диагностики плазмноклеточных опухолей (EuroFlow, 2012).

Результаты. Оценена экспрессия $\beta 2$ -микροглобулина в сочетании с маркерами CD45, CD56 и CD19 на опухолевых плазматических клетках, представлены иллюстрации экспрессии этих маркеров. Из 37 больных множественной миеломой гиперэкспрессия $\beta 2$ -микροглобулина выявлена у 23 (62,2 %), в остальных случаях отмечены нормальные или сниженные уровни данного белка.

Заключение. Опухолевые плазматические клетки гиперэкспрессируют $\beta 2$ -микροглобулин в значительном числе случаев (62,2 %). Это позволяет в дальнейшем оценить клиническое значение подобной aberrантной экспрессии и ее соотношение с сывороточными уровнями $\beta 2$ -микροглобулина.

Ключевые слова: $\beta 2$ -микροглобулин, множественная миелома, плазматические клетки, костный мозг, многоцветная проточная цитометрия

Для цитирования: Тупицын Н.Н., Толстых Е.Э. Экспрессия $\beta 2$ -микροглобулина на злокачественных клетках множественной миеломы. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(2):60–4. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-2-60-64

Expression of $\beta 2$ microglobulin on malignant multiple myeloma plasma cells

Nikolay N. Tupitsyn, Elena E. Tolstyk

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia

Contacts: Elena Eduardovna Tolstyk Elenatolstyk1@gmail.com

Background. $\beta 2$ -microglobulin is a low molecular weight glycoprotein that is part of the major histocompatibility complex. The concentration of $\beta 2$ -microglobulin in the blood serum of patients increases with various oncohematological pathologies, including multiple myeloma. One of the methods for detecting membrane $\beta 2$ -microglobulin is flow cytometry. This article discusses the expression of $\beta 2$ -microglobulin and key markers on the membrane of malignant cells in patients with multiple myeloma at the onset of the disease.

Aim. To study the expression of $\beta 2$ -microglobulin and markers CD45, CD56 and CD19 on the membrane of tumor plasma cells in the primary diagnosis of multiple myeloma.

Materials and methods. The study of β 2-microglobulin and CD45, CD56 and CD19 was carried out in 37 patients with multiple myeloma by 8-color flow cytometry using a panel of monoclonal antibodies for the diagnosis of plasma cell tumors (EuroFlow, 2012).

Results. The expression of β 2-microglobulin in combination with markers CD45, CD56 and CD19 on tumor plasma cells was assessed, illustrations of the expression of these markers are presented. Out of 37 patients with multiple myeloma, hyperexpression of β 2-microglobulin was noted in 23 (62.2 %), in other cases there were normal or reduced levels of this protein in other cases.

Conclusion. Tumor plasma cells overexpress β 2-microglobulin in a significant percentage of cases (62.2 %). This allows further assessment of the clinical significance of such aberrant expression and its relationship with serum levels of β 2-microglobulin.

Keywords: β 2-microglobulin, multiple myeloma, plasma cells, bone marrow, multicolor flow cytometry

For citation: Tupitsyn N.N., Tolstykh E.E. Expression of β 2 microglobulin on multiple myeloma malignant cells. Russian Journal of Biotherapy 2023;22(2):60–4. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-2-60-64

Введение

В 1968 г. И. Беггард и А. Берн впервые выделили β 2-микроглобулин из мочи пациентов с нарушениями проксимальных канальцев почек [1].

β 2-микроглобулин — низкомолекулярный белок, присутствующий на поверхности ядросодержащих клеток в качестве легкой цепи антигена главного комплекса гистосовместимости (HLA). Молекулы МНС I находятся на каждой ядросодержащей клетке организма, и их функция заключается в представлении коротких эндогенных или экзогенных пептидов (обеспечение процесса антигенной презентации) [2].

Выживание опухоли может обеспечиваться за счет механизмов подавления синтеза β 2-микроглобулина или нарушения его связывания в комплексе МНС I. Снижение функциональной активности β 2-микроглобулина при этом ведет к трем основным эффектам: снижению уровня активации CD8⁺-Т-лимфоцитов в ходе антигенной презентации, подавлению функции NK-клеток, повышению интенсивности катаболизма иммуноглобулинов класса G. Посредством этих эффектов реализуется подавление клеточного и гуморального иммунного ответа, что обеспечивает избегание опухолью иммунного надзора [3].

β 2-микроглобулин является значимым сывороточным маркером опухолевой нагрузки при гематологических злокачественных новообразованиях, особенно при множественной миеломе (ММ) [4–6]. Его концентрация увеличивается при различных патологиях. Основной функцией β 2-микроглобулина является обеспечение процесса антигенной презентации, кроме того, β 2-микроглобулин вовлечен в механизмы пролиферации, апоптоза и способен индуцировать экспрессию интерлейкинов 6, 8 и 10 [4–7].

M. Perez-Andres и соавт. провели исследовательскую работу по изучению клинического значения как растворимых, так и поверхностных уровней молекул, участвующих во взаимодействии между aberrантными плазматическими клетками (ПК) и иммунологическим окружением костного мозга. Впервые

у пациентов с ММ исследовали потенциальную связь между сывороточным и мембранным уровнями молекул β 2-микроглобулина, а также их влияние на прогноз заболевания. Общая выживаемость больных ММ была взаимосвязана с уровнями поверхностных (мембранных) и растворимых (сывороточных) молекул β 2-микроглобулина [8]. Более высокие уровни β 2-микроглобулина в сыворотке крови были связаны с более короткой выживаемостью, а также с неблагоприятными клиническими и биологическими характеристиками заболевания. Однако хорошая выживаемость отмечена при высоких уровнях β 2-микроглобулина на мембране опухолевых ПК костного мозга. Обратную корреляцию между β 2-микроглобулином в сыворотке крови и β 2-микроглобулином на мембране миеломных ПК можно использовать как прогностический фактор у пациентов с ММ [8].

Цель исследования — изучение экспрессии β 2-микроглобулина и маркеров CD45, CD56 и CD19 на мембране опухолевых ПК при первичной диагностике ММ.

Материалы и методы

Исследование костного мозга пациентов с ММ проведено в лаборатории иммунологии гемопоэза Научно-исследовательского института клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Экспрессия β 2-микроглобулина на ПК была изучена у 37 больных ММ.

Методом диагностики была 8-цветная проточная цитофлуориметрия на приборе FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с использованием панели моноклональных антител (Becton Dickinson, США) для плазматических опухолей, предложенной европейским консорциумом EuroFlow в 2012 г. [9] (см. таблицу).

Важно отметить, что при применении панели EuroFlow были выявлены проблемы, связанные с высокими уровнями экспрессии CD38 и β 2-микроглобулина

Панель моноклональных антител для диагностики плазмноклеточных опухолей [9]

Panel of monoclonal antibodies for the diagnosis of plasma cell tumors [9]

PacBlue\V450	PacOr\V500	FITC	PE	PE-cy5	PE-cy7	APC	APC-H7
CD45	CD138	CD38	CD56	β 2-micro	CD19	cyIg-kappa	cyIg-lambda
CD45	CD138	CD38	CD28	CD27	CD19	CD117	CD81

на нормальных ПК при использовании флуорохром-конъюгированных антител FITC и PerCP-cy5.5 соответственно. Нами были учтены и применены рекомендации EuroFlow (разведение антител согласно рекомендациям) при использовании панели антител для улучшения полученных результатов [9]. Для снижения интенсивности флуоресценции (рекомендации EuroFlow) каждого маркера (CD38 и β 2-микроглобулина) использовали неконъюгированные реагенты тех же клонов путем их смешивания. Смесь неконъюгированного и конъюгированного реагентов позволила улучшить результаты. Оптимальное окрашивание CD38 (клон LD38) было получено с использованием смеси 3/2 конъюгированного и неконъюгированного антител и β 2-микроглобулина (клон TU99), 19/1 конъюгированного и неконъюгированного антител.

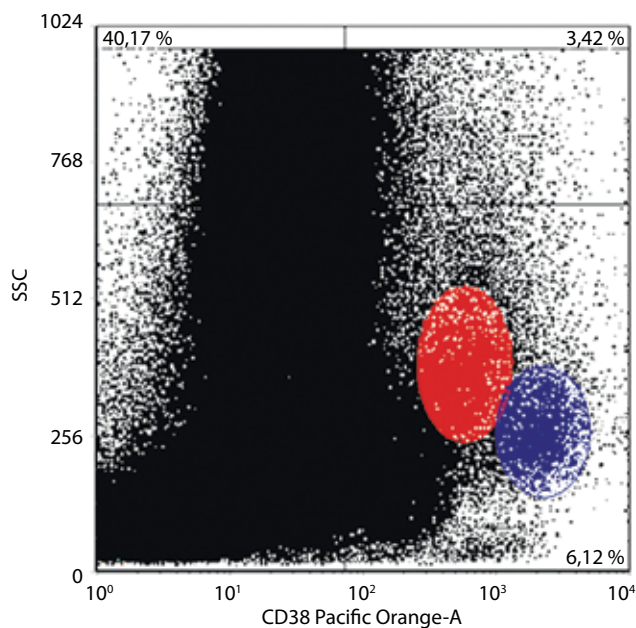


Рис. 1. Нормальная (синий цвет) и неопластическая (красный цвет) популяции плазматических клеток. По оси абсцисс – экспрессия CD38 (PacOr), по оси ординат – уровни бокового светорассеяния SSC. Экспрессия CD38 на нормальных плазматических клетках яркая, положительная, на опухолевых – слабая, отрицательная

Fig. 1. Normal (blue) and neoplastic (red) plasma cell populations. Abscissa, CD38 (PacOr) expression; ordinate, SSC side scatter levels. Expression of CD38 on normal plasma cells is bright and positive, while on tumor cells it is weak and negative

На первом этапе иммунофенотипического анализа исключали дуплеты клеток и дебрис. Анализ данных начинали с выявления популяции ПК из общего количества миелокариоцитов костного мозга (гейт CD38⁺ и CD138⁺). Антиген CD38 считается маркером ПК и используется для оценки количества как нормальных, так и миеломных ПК. Гейтирование по двум маркерам – CD38⁺ и CD138⁺ – повышает специфичность выделения ПК.

Результаты

У 37 больных ММ был оценен уровень экспрессии β 2-микроглобулина на ПК в дебюте заболевания.

На первом этапе, не во всех случаях диагностики, можно сразу увидеть четкое разделение на 2 популяции ПК – неопластическую и нормальную, определить количество этих клеток и проанализировать эти популяции.

На рис. 1 отражены 2 популяции, одна из них представлена нормальными ПК (популяция синего цвета, с более выраженной экспрессией антигена),

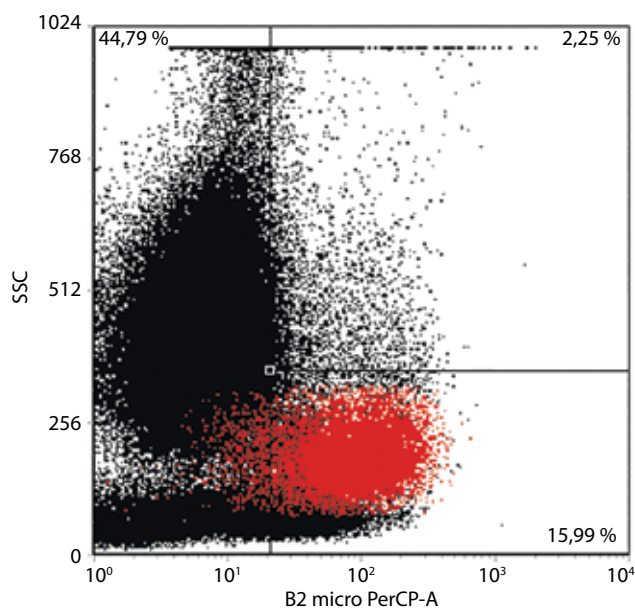


Рис. 2. Экспрессия β 2-микроглобулина на плазматических клетках. По оси абсцисс – экспрессия β 2-микроглобулина (PerCP), по оси ординат – уровни бокового светорассеяния SSC

Fig. 2. Expression of β 2-microglobulin on plasma cells. Abscissa, β 2-microglobulin (PerCP) expression; ordinate, SSC side scatter levels

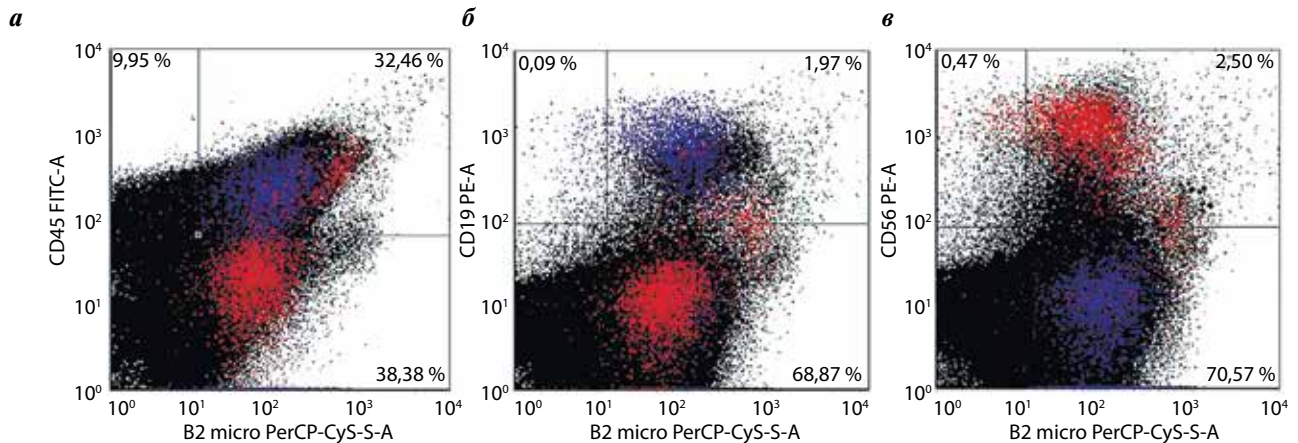


Рис. 3. Нормальная (синий цвет) и неопластическая (красный цвет) популяции плазматических клеток по экспрессии маркеров $\beta 2$ -микроглобулина (PerCP-Cy5.5) и CD45 (FITC) (а), $\beta 2$ -микроглобулина (PerCP-Cy5.5) и CD19 (PE) (б), $\beta 2$ -микроглобулина (PerCP-Cy5.5) и CD56 (PE) (в)

Fig. 3. Normal (blue) and neoplastic (red) population of plasma cells by expression of $\beta 2$ -microglobulin (PerCP-Cy5.5) and CD45 (FITC) (a), $\beta 2$ -microglobulin and CD19 (PE) (б), $\beta 2$ -microglobulin and CD56 (PE) (в) markers

другая — опухолевыми (неопластическими) ПК (популяция красного цвета).

На рис. 2 представлен пример гиперэкспрессии $\beta 2$ -микроглобулина на плазматических злокачественных клетках ММ.

Пример отсутствия гиперэкспрессии $\beta 2$ -микроглобулина на CD45-негативных, CD19-негативных и CD56-позитивных злокачественных клетках ММ представлен на рис. 3.

В исследуемой группе больных ММ распределение выявленных вариантов экспрессии мембранного $\beta 2$ -микроглобулина было следующим: гиперэкспрессия — у 23 (62,2 %) из 37 пациентов, нормальная экспрессия — у 10 (27,0 %) и сниженная — у 4 (10,8 %). Таким образом, в дебюте заболевания более чем у половины пациентов наблюдается гиперэкспрессия $\beta 2$ -микроглобулина на ПК.

Заключение

В работе представлены данные об экспрессии $\beta 2$ -микроглобулина на опухолевых ПК ММ. Частота мембранной гиперэкспрессии составила 62,2 %. Продемонстрирована возможность оценки уровней $\beta 2$ -микроглобулина в сочетании с ключевыми маркерами aberrантности ПК CD45, CD19, CD56. Учитывая тот факт, что aberrантность (гиперэкспрессия) $\beta 2$ -микроглобулина на злокачественных клетках ММ при диагностике ниже, чем aberrантность маркеров CD45, CD19, CD56, становится возможным сформировать группы сравнения показателей выживаемости в зависимости от уровней мембранного $\beta 2$ -микроглобулина и сопоставить эти данные с соответствующими показателями для сывороточного $\beta 2$ -микроглобулина.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Berggård I., Bearn A.G. Isolation and properties of a low molecular weight beta-2-globulin occurring in human biological fluids. *J Biol Chem* 1968;243(15):4095–103.
- Esposito G., Ricagno S., Corazza A. et al. The controlling roles of Trp60 and Trp95 in $\beta 2$ -microglobulin function, folding and amyloid aggregation properties. *J Mol Biol* 2008;378(4):887–97. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.03.002
- Ardeniz O., Unger S., Onay H. et al. $\beta 2$ -microglobulin deficiency causes a complex immunodeficiency of the innate and adaptive immune system. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136(2):392–401. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.12.1937
- Becker J.W., Reeke G.N. Jr. Three-dimensional structure of beta2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82(12):4225–9. DOI: 10.1073/pnas.82.12.4225
- Bicknell D.C., Rowan A., Bodmer W.F. Beta2 -microglobulin gene mutations: A study of established colorectal cell lines and fresh tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1994;91(11):4751–5. DOI: 10.1073/pnas.91.11.4751
- Vivian J.P., Duncan R.C., Berry R. et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL1-mediated recognition of human leukocyte antigen B. *Nature* 2011;479(7373):401–5. DOI: 10.1038/nature10517
- Palumbo A., Avet-Loiseau H., Oliva S. et al. Revised International Staging System for multiple myeloma: a report from International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol* 2015;33(26):2863–9. DOI: 10.1200/JCO.2015.61.2267
- Perez-Andres M., Almeida J., Martin-Ayuso M. et al. Soluble and membrane levels of molecules involved in the interaction between clonal plasma cells and the immunological microenvironment in multiple myeloma and their association with the characteristics of the disease. *Cancer* 2009;124(2):367–75. DOI: 10.1002/ijc.23941
- Van Dongen J.J., Lhermitte L., Bottcher S. et al. EuroFlow anti-body panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012;26(9):1908–75. DOI: 10.1038/leu.2012.120

Вклад авторов

Н.Н. Тупицын: руководство проведением исследования, анализ данных, написание и редактирование текста статьи;

Е.Э. Толстых: разработка дизайна исследования, получение и анализ данных, написание и оформление текста статьи, перевод на английский язык.

Authors' contribution

N.N. Tupitsyn: management of the research, data analysis, writing and editing of the article;

E.E. Tolstykh: research design development, data acquisition and analysis, writing and formatting of the text of the article, translation into English.

ORCID авторов / ORCID of authors

Н.Н. Тупицын / N.N. Tupitsyn: <https://orcid.org/0000-0003-3966-128X>

Е.Э. Толстых / E.E. Tolstykh: <https://orcid.org/0000-0003-0593-6900>

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 30.10.2022. Принята к публикации: 24.04.2023.

Article received: 30.10.2022. Accepted for publication: 24.04.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-2-65-73>

Получение и исследование свойств композиций ресвератрола с солюбилизаторами

С.П. Кречетов¹, М.С. Масленникова^{2,3}, А.Ю. Куксин⁴, А.Д. Малинкин², Н.Л. Соловьева³, И.И. Краснюк³

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Академика Опарина, 4;

²ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи»; Россия, 109240 Москва, Устьинский проезд, 2/14;

³ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

⁴Физтех-школа биологической и медицинской физики ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»; Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9

Контакты: Мария Сергеевна Масленникова sok.mary.serg@gmail.com

Введение. Поиск технологии или использование вспомогательных веществ для разработки лекарственных препаратов, содержащих малорастворимые фармацевтические субстанции, – актуальная задача фармации. По биофармацевтической классификационной системе ресвератрол относится к 4-му классу, субстанция малорастворима и обладает низкой проницаемостью. Поэтому одной из приоритетных задач разработки лекарственных препаратов с ресвератролом является повышение его растворимости и, как следствие, увеличение проницаемости. В статье представлены результаты физико-химических исследований композиций ресвератрола с солюбилизаторами (полоксамером 407, полисорбатом 80, метил-бета-циклодекстрином) после растворения в общем растворителе с последующим упариванием.

Цель исследования – получение композиций ресвератрола с солюбилизаторами и вспомогательными веществами с дальнейшим исследованием их свойств для разработки твердых лекарственных форм.

Материалы и методы. Транс-ресвератрол, полоксамер 407, полисорбат 80, метил-бета-циклодекстрин, лимонная и аскорбиновая кислоты, глицерин, метанол; высокоэффективная жидкостная хроматография, дифференциальная сканирующая калориметрия.

Результаты. Проведены физико-химические исследования полученных композиций ресвератрола со вспомогательными веществами: лимонной и аскорбиновой кислотами для всех разработанных образцов, а также глицерином для композиций с твином 80. Исследования стабильности проводили в условиях «ускоренного старения», в результате чего было установлено заметное уменьшение количества ресвератрола (до 80 % от исходного). Проведенные исследования устойчивости ресвератрола в образцах показали, что его содержание практически не меняется на протяжении 2 сут при низких pH, присущих кислотности желудочного сока. А при pH, близких к нейтральным, содержание ресвератрола снижается до 90 % от исходного количества. Полученные результаты указывают на возможность и целесообразность разработки лекарственных препаратов, способствующих всасыванию ресвератрола в желудке.

Заключение. Получены композиции ресвератрола с солюбилизаторами, и обоснован выбор вспомогательных веществ для разработки твердых лекарственных форм. Даны рекомендации по получению твердых лекарственных форм для каждого из разработанных составов, и определены условия хранения.

Ключевые слова: ресвератрол, растворение, солюбилизатор, композиция, твердый раствор

Для цитирования: Кречетов С.П., Масленникова М.С., Куксин А.Ю. и др. Получение и исследование свойств композиций ресвератрола с солюбилизаторами. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(2):65–73. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-2-65-73

Preparation and investigation of properties of resveratrol and solubilizers compositions

Sergey P. Krechetov¹, Maria S. Maslennikova^{2,3}, Aleksey Yu. Kuksin⁴, Aleksey D. Malinkin², Natalia L. Solovieva³, Ivan I. Krasnyuk³

¹V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia; 4 Akademika Oparina St., Moscow 117997, Russia;

²Scientific Research Institute of Nutrition, Biotechnology and Food Safety; 2/14 Ust'inskiy proezd, Moscow 109240, Russia;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University); Bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;

⁴Phystech School of Biological and Medical Physics of the Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University); 9 Institutskiy Ln., Dolgoprudny 141701, Russia

Contacts: Maria Sergeevna Maslennikova sok.mary.serg@gmail.com

Background. The search for technology or the use of excipients for the development of drugs containing poorly soluble pharmaceutical substances is an urgent task of pharmacy. According to the biopharmaceutical classification system, resveratrol belongs to group 4: the substance has low solubility and low permeability. Therefore, one of the priorities in the development of drugs with resveratrol is to increase its solubility and, as a result, increase its permeability. The article presents the results of physicochemical studies of resveratrol compositions with solubilizers (poloxamer 407, polysorbate 80, methyl-beta-cyclodextrin) after dissolution in a common solvent followed by evaporation.

Aim. Obtaining compositions of resveratrol with solubilizers and auxiliary formations with an exclusive study of their properties for the development of solid dosage forms.

Materials and methods. Trans-resveratrol, poloxamer 407, polysorbate 80, methyl-beta-cyclodextrin, citric and ascorbic acids, glycerin, methanol; high performance liquid chromatography, differential scanning calorimetry.

Results. Physical and chemical studies of the obtained compositions of resveratrol with excipients were carried out. Excipients used: citric and ascorbic acids for all compositions, as well as glycerin for compositions with tween 80. Stability studies were carried out under conditions of "accelerated aging", as a result of which a noticeable decrease in the amount of resveratrol was found (80 % of the original). Studies of the stability of resveratrol have shown that at low pH, inherent in the stomach, its content remains practically unchanged for two days. And at pH close to neutral, the content of resveratrol is reduced to 90 % of the original amount. The obtained results indicate the feasibility of developing drugs that promote the absorption of resveratrol in the stomach and are stored at low temperatures (in the refrigerator).

Conclusion. Compositions of resveratrol with solubilizers were obtained and the choice of excipients for the development of solid dosage forms was substantiated. Recommendations are given for obtaining solid dosage forms for each of the developed formulations and storage conditions are determined.

Keywords: resveratrol, dissolution, solubilizer, composition, solid solution

For citation: Krechetov S.P., Maslennikova M.S., Kuksin A.Yu. et al. Preparation and investigation of properties of resveratrol and solubilizers compositions. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(2):65–73. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-2-65-73

Введение

Использование солюбилизаторов в составе лекарственных препаратов рассматривается как перспективный способ повышения растворимости и, следовательно, биодоступности фармацевтических субстанций (ФС), плохо растворимых в воде [1]. При этом максимальные скорость растворения и концентрация ФС в растворе достигаются при наличии в лекарственном препарате композиции ФС с солюбилизатором в виде растворов или микродисперсий [2]. Поскольку прямое растворение или диспергирование ФС в солюбилизаторе в обычных условиях оказывается либо невозможным (твердые солюбилизаторы), либо очень длительным (жидкие солюбилизаторы), то для получения композиций применяют технологии, предполагающие совместное расплавление, растворение в общем растворителе или измельчение [3]. Использование растворения в общем растворителе является наиболее привлекательным технологическим подходом, поскольку позволяет в мягких условиях получать композиции в виде рас-

воров ФС в солюбилизаторе, обладающие большей стабильностью и обеспечивающие лучшую растворимость ФС по сравнению с дисперсиями [2, 3].

Проведенные исследования солюбилизации ресвератрола поллоксамерами, полисорбатами, циклодекстринами показали, что получаемое исходя из молярного коэффициента солюбилизации оптимальное содержание ресвератрола в композициях с данными солюбилизаторами имеет значения 1–10 % [4]. В данной работе получены композиции ресвератрола с указанными солюбилизаторами с применением технологии, предполагающей растворение в общем растворителе, и оценена возможность использования для стабилизации ресвератрола в композициях органических кислот: лимонной, образующей хелатные соединения с металлами [5], и аскорбиновой, обладающей восстановительной способностью [6].

Цель исследования — получить композиции ресвератрола с солюбилизаторами и вспомогательными веществами с дальнейшим исследованием их свойств для разработки твердых лекарственных форм.

Материалы и методы

Фармацевтическая субстанция с содержанием не менее 99 % транс-ресвератрола resVida была получена от DSM (Швейцария). В работе использовали полоксамер Kolliphor 407 (P407) от BASF (Германия); полисорбат Tween 80 (T80), лимонную и аскорбиновую кислоты, глицерин от Sigma-Aldrich (США); метил-бета-циклодекстрин (CD) от Wacker Chemie AG (Германия). Метанол, а также реактивы, использовавшиеся для приготовления буферных растворов (далее «среда растворения»), имели квалификацию «химически чистый» и были получены от компании «Кемикал Лайн» (Россия). В работе использовали 50 мМ солянокислый буфер с рН 1,2 и 50 мМ фосфатный буфер с рН 6,8. Для приготовления буферных растворов использовали воду очищенную (ФС.2.2.0020.18), полученную на установке обратного осмоса УВОИ-1812С6 («НПК МЕДИАНА-ФИЛЬТР», Россия). Для хроматографии использовали высокоочищенную воду (18 МОм/см), полученную на установке Milli-Q (Millipore, Германия).

При приготовлении композиций ресвератрола с солюбилизаторами входящие в их состав ингредиенты растворяли в метаноле при 40 °С в колбе для упаривания. Масса метанола равнялась суммарной массе ингредиентов, входящих в состав композиций. Затем на ротационном испарителе Hei-VAP Advantage (Heidolph, Германия) с вакуумным насосом PC 3001 VarioPro (Vacuubrand, Германия) из получаемых растворов удаляли растворитель путем упаривания при той же температуре и скорости вращения 60 об/мин постепенно, без закипания, снижая давление до 5 мБар, с последующим выдерживанием при этом давлении в течение 1 ч. Твердые композиции соскабливали со стенок колб, измельчали, растирая в фарфоровой ступке, и просеивали через сито с отверстиями диаметром 3 мм. После этого композиции выдерживали в течение 2 ч при вакууме менее 0,5 мБар, создаваемом форвакуумным насосом EVD-6 (Eurovacuum, Нидерланды).

Термическое исследование композиций проводили на дифференциальном сканирующем калориметре ДСК-500 (Самарский ГТУ, Россия), работающем под управлением программного обеспечения «Термоскан». Измерения проводили при нагревании от 30 до 300 °С со скоростью 10 °С/мин с использованием образцов массой 11–15 мг, помещенных в алюминиевые капсулы. Капсулу сравнения оставляли пустой. Измеряли разность температур капсулы с образцом и капсулы сравнения, которая пропорциональна мощности выделения или поглощения тепла, сопровождающего физико-химические превращения в образце.

Исследование растворения композиций проводили с помощью online-системы, состоящей из тес-

тера растворения DT 820 (ERWEKA, Германия) с лопастными мешалками, спектрофотометра UV-1800 (Shimadzu, Япония) и 8-канального насоса IPC (Ismatec, Германия), работающих под управлением программного обеспечения Disso. Net 2.9.0.0. Испытание проводили при температуре $37 \pm 0,5$ °С, объеме среды растворения 500 мл и скорости перемешивания 50 об/мин для композиций с P407 и CD или 100 об/мин для композиций с T80. Навески композиций с ресвератролом вносили в сосуды, заполненные средой растворения, на крышках от чашек Петри диаметром 35 мм, которые размещали на дне сосудов непосредственно перед началом перемешивания. В качестве стандартов использовали растворы ресвератрола с концентрацией 0,03 мг/мл в соответствующих буферах. Отбор проб осуществлялся через фильтры (Poroplast, ERWEKA, Германия) с размером отверстий 20 мкм. Накопление ресвератрола в растворах регистрировали по изменению оптической плотности при длине волны 360 нм, расположенной на краю длинноволнового плеча пика поглощения ресвератрола, из-за очень высокой оптической плотности растворов в максимуме поглощения.

Исследование стабильности ресвератрола в композициях проводили в условиях «ускоренного старения» при повышенной температуре. Образцы композиций в герметично закрытых пробирках помещали в термостатируемый шкаф ED 23 (Binder, Германия) и хранили при температуре $51 \pm 0,3$ °С. Для определения содержания ресвератрола по 25 мг хранящихся композиций при комнатной температуре растворяли в 5 мл воды при перемешивании в течение 15 мин на шейкере OS-10 (BIOSAN, Латвия). Затем полученные растворы сразу разводили в 50 раз и использовали для хроматографического анализа.

Для оценки стабильности ресвератрола в водных растворах композиций брали по 25 мг свежеприготовленных образцов при комнатной температуре, растворяли в 5 мл буферов с разными рН в герметично закрытых пробирках перемешиванием в течение 15 мин на шейкере и затем помещали в темное место. Стабильность чистого ресвератрола в буферах исследовали в растворах с концентрацией 10 мкг/мл. Для определения содержания ресвератрола по 100 мкл растворов отбирали в мерные колбы объемом 5 мл, добавляли воду до метки и полученный раствор сразу использовали для хроматографического анализа.

Хроматографическое определение ресвератрола проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным спектрофотометрическим детектором 1260 Infinity DAD и колонкой Poroshell 120 EC-C18, $4,6 \times 50$ мм, 2,7 мкм (Agilent Technologies, США). Применяли изократическое элюирование смесью 0,1 % водного раствора уксусной кислоты и ацетонитрила в соотношении

70:30 при температуре колонки 30 °С, скорости подачи подвижной фазы 0,7 мл/мин, объеме вводимой пробы 2 мкл. Детектирование осуществлялось при длине волны 307 нм. Обработку хроматографических данных проводили с помощью программного обеспечения Agilent ChemStation (Agilent Technologies, США).

Статистическую обработку экспериментальных данных выполняли с использованием программы Microsoft Excel. Приводимые экспериментальные данные представляют собой средние значения по результатам 3 независимых измерений.

Результаты и обсуждение

Устойчивое распределение ФС в солюбилизаторе – важное условие, определяющее возможность использования композиций для создания лекарственного препарата. Если для композиций в виде твердых дисперсий и твердых растворов это требование всегда соблюдается в силу невозможности их расслоения, то для жидких композиций предпочтительным является использование растворов из-за склонности суспензий к расслоению. Поэтому использование в разработках в качестве солюбилизатора жидкого Т80 потребовало проведения предварительной оценки состава композиций, существующих в виде растворов при наличии в них лимонной и аскорбиновой кислот.

Предварительные исследования показали, что использование технологии растворения в общем растворителе позволяет получить раствор лимонной кислоты в Т80 с концентрацией не менее 5 %. При использовании 0,8 и 8 % аскорбиновой кислоты (количества эквимолярного 1 и 10 % ресвератрола соответственно) от массы композиции раствор не получается: появляются признаки опалесценции. Однако композиция, содержащая 10 % ресвератрола и по 2,5 % глицерина, аскорбиновой и лимонной кислот, в течение длительного времени сохраняет прозрачность. С учетом описанных предварительных исследований в данной работе были получены композиции, состав которых приведен в табл. 1. В композициях с твердыми солюбилизаторами содержание аскорбиновой кислоты составило 8 и 2,5 %. Первое было выбрано как эквимолярное 10 % ресвератрола, а второе – как равное выбранному из предварительных исследований с Т80.

Полученные композиции имели внешний вид (физическое состояние), соответствующий входящему в их состав солюбилизатору (табл. 2). Присутствие аскорбиновой кислоты в количестве 2,5 % сопровождалось получением неокрашенных композиций, тогда как все остальные композиции имели слабый, в большинстве случаев коричневатый, оттенок, что

Таблица 1. Составы исследованных композиций ресвератрола (I) с солюбилизаторами

Table 1. Compositions of the studied compositions of resveratrol (I) with solubilizers

Композиция Composition	Содержание в композиции, % Content in composition, %						
	I	P407	T80	CD	CA	AA	Глицерин Glycerin
I + P407	10	90	–	–	–	–	–
I + P407 + CA	10	85	–	–	5	–	–
I + P407 + 2,5 % AA	10	87,5	–	–	–	2,5	–
I + P407 + 8 % AA	10	82	–	–	–	8	–
I + T80	10	–	90	–	–	–	–
I + T80 + CA	10	–	85	–	5	–	–
I + T80 + CA + AA	10	–	82,5	–	2,5	2,5	2,5
I + CD	10	–	–	90	–	–	–
I + CD + CA	10	–	–	85	5	–	–
I + CD + 2,5 % AA	10	–	–	87,5	–	2,5	–
I + CD + 8 % AA	10	–	–	82	–	8	–

Примечание. Здесь, в табл. 2 и на рис. 1–4: P407 – полуксамер 407; T80 – полисорбат 80; CA – лимонная кислота; AA – аскорбиновая кислота; CD – метил-бета-циклодекстрин.

Note. Here, in table 2 and on fig. 1–4: P407 – poloxamer 407; T80 – polysorbate 80; CA – citric acid; AA – ascorbic acid; CD – methyl beta cyclodextrin.

Таблица 2. Свойства исследованных композиций ресвератрола (I) с солюбилизаторами

Table 2. Properties of the studied compositions of resveratrol (I) with solubilizers

Композиция Composition	Внешний вид Appearance	Цвет Color	pH 1 % водного раствора при 22 °С pH 1 % aqueous solution at 22 °C	Температура плавления по ДСК, °С Melting point by DSC, °C
I + P407	Порошок аморфного вещества Amorphous substance powder	С коричневатым оттенком With a brownish tinge	6,2	53
I + P407 + CA		С желтоватым оттенком With a yellowish tinge	3,0	51
I + P407 + 2,5 % AA		Белый White	3,4	51
I + P407 + 8 % AA		С сероватым оттенком With a grayish tinge	3,2	50
I + T80	Прозрачная вязкая жидкость Transparent viscous liquid	Светло-коричневая Light brown	6,2	—
I + T80 + CA		С коричневатым оттенком With a brownish tinge	3,0	—
I + T80 + CA + AA		Бесцветная Colorless	3,1	—
I + CD	Порошок карамелеподобного вещества Caramel-like substance powder	С желтоватым оттенком With a yellowish tinge	5,1	246
I + CD + CA		С розоватым оттенком With a pinkish tinge	3,1	236
I + CD + 2,5 % AA		Белый White	3,5	244
I + CD + 8 % AA		С коричневатым оттенком With a brownish tinge	3,3	252

Примечание. ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия.
Note. DSC – differential scanning calorimetry.

может отражать какие-то химические превращения исходных практически неокрашенных ингредиентов. Таким образом, наличие в композициях аскорбиновой кислоты в качестве восстановителя приводит к отсутствию явных признаков химических превращений компонентов композиций и улучшению органолептических показателей продукта (получение белого цвета). Однако высокое содержание этого ингредиента может приводить к усилению химических превращений в композициях. Присутствие в составе композиций органических кислот обусловило низкие значения pH соответствующих водных растворов, тогда как при отсутствии используемых в работе стабилизирующих добавок pH растворов был близок к нейтральному.

Исследование с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии твердых композиций ресвератрола с P407 и CD выявило отсутствие пиков плавления ресвератрола и органических кислот (рис. 1), что является признаком образования композиций в виде твердых растворов данных соединений

в солюбилизаторе. При этом пики плавления солюбилизаторов сохранились, однако их вид и положение в присутствии дополнительных ингредиентов несколько изменились. Соответствующие значения температур в максимумах этих пиков приведены в табл. 2 в качестве температур плавления композиций.

Исследования растворения полученных композиций в воде при pH, соответствующих различным отделам желудочно-кишечного тракта, показали, что в обоих случаях наблюдается быстрое и полное растворение 50 мг композиции в 500 мл воды, что дает расчетную концентрацию ресвератрола в растворе 0,1 мг/мл (0,44 мМ) (рис. 2). Указанная концентрация не менее чем в 2 раза превышает известную по данным литературы растворимость ресвератрола (менее 0,05 мг/мл или 0,22 мМ) в воде [4, 7]. На рис. 2 полученный результат отражает более высокое расположение кривых изменения оптической плотности в пробах с композициями по сравнению с образцами, содержащими такое же количество чистого ресвератрола, который полностью не растворяется и обнаруживается

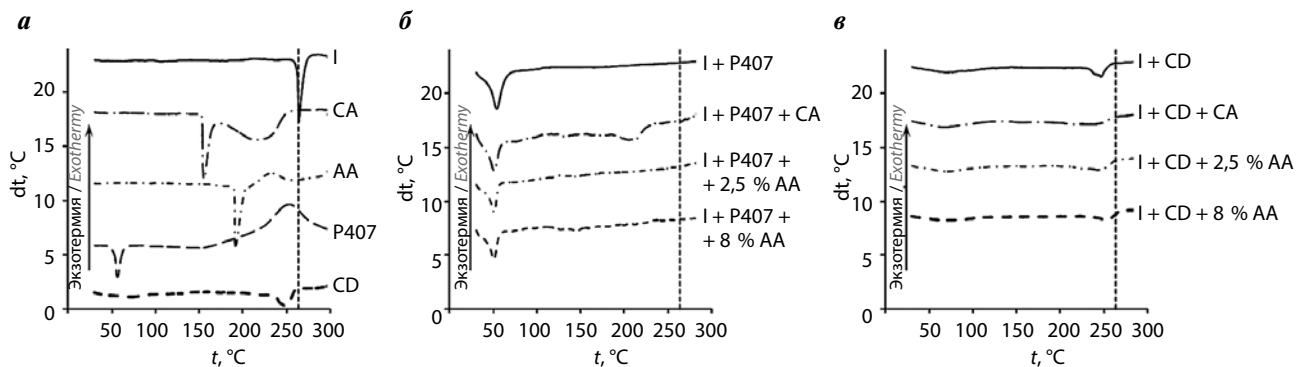


Рис. 1. Кривые дифференциальной сканирующей калориметрии композиций ресвератрола (I) с твердыми солюбилизаторами и входящих в их состав ингредиентов: а – ингредиенты композиций; б – композиции с P407; в – композиции с CD. Вертикальная пунктирная линия соответствует положению пика плавления ресвератрола (264 °C)

Fig. 1. Differential scanning calorimetry curves of compositions of resveratrol (I) with solid solubilizers and their constituent ingredients: a – composition ingredients, b – compositions with P407, c – compositions from the CD. The vertical dotted line corresponds to the position of the melting peak of resveratrol (264 °C)

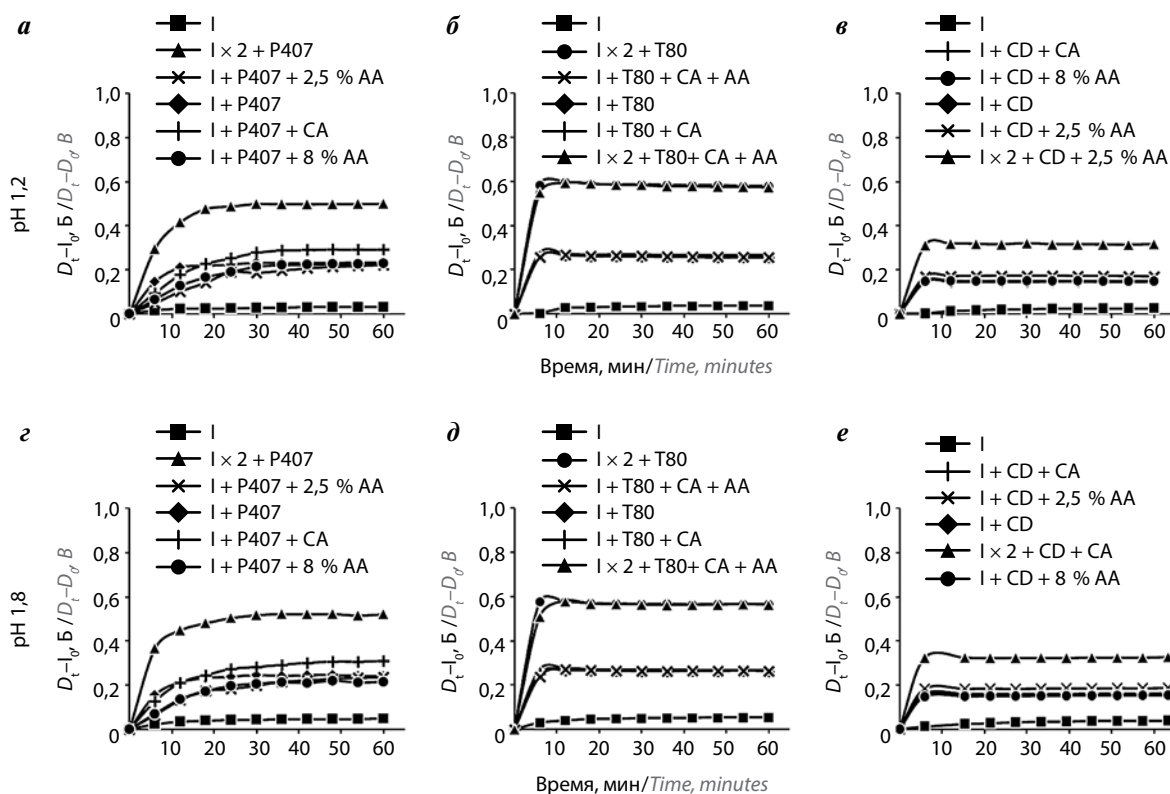


Рис. 2. Кинетика растворения ресвератрола (I) и его композиций с солюбилизаторами при pH в разных отделах желудочно-кишечного тракта: а, г – композиции с P407; б, д – композиции с T80; в, е – композиции с CD. На оси ординат отражен прирост оптической плотности растворов композиций при 360 нм. I x 2 – пробы с удвоенным количеством композиций (дополнительные пояснения в тексте)

Fig. 2. Kinetics of dissolution of resveratrol (I) and its compositions with solubilizers at pH of different parts of the gastrointestinal tract: a, g – compositions with P407; б, д – compositions with T80; в, е – compositions from the CD. The Y-axis shows the increase in the optical density of solutions of the compositions at 360 nm. I x 2 is used for samples with twice the number of compositions (additional explanations in the text)

в виде осадка в соответствующих стаканах тестера растворения. Увеличение в 2 раза растворяемых количеств композиций также сопровождается их полным растворением, что характеризуется в 2 раза более высокими значениями оптических плотностей и отражает, соответственно, большее содержание ресве-

ратрола в растворе (см. рис. 2). Полученный результат позволяет утверждать, что ограничение на переход ресвератрола в растворенную в воде форму при использовании полученных композиций будет определяться растворимостью солюбилизатора в воде, и в условиях полного растворения солюбилизатора

всегда будет иметь место полное растворение ресвератрола.

Кинетика растворения композиций показывает, что по выходу кривых растворения на плато в случае T80 и CD растворение композиций происходит быстро и завершается в течение 5 мин. Растворение композиций с P407 происходит существенно медленнее и практически полностью завершается через 30–45 мин.

Одинаковый состав среды растворения в пробах с чистым ресвератролом и контрольных образцах позволил по измеряемым оптическим плотностям сделать расчет концентраций ресвератрола в указанных пробах в конце инкубации (60 мин). Эта концентрация составила $0,036 \pm 0,004$ мг/мл ($0,16 \pm 0,02$ мМ) для pH 1,2 и $0,038 \pm 0,005$ мг/мл ($0,17 \pm 0,02$) – для pH 6,8, что близко к полученным ранее значениям насыщенных концентраций [4].

Оценка стабильности полученных композиций в условиях «ускоренного старения» при 51 °C показала (рис. 3), что начиная с 6-х суток (для композиций с P407 и T80) и 12-х суток (для композиций с CD) в них наблюдается заметное уменьшение определяемого количества ресвератрола, которое к 24-м суткам достигает 80 % от исходного. С учетом приведенных в ОФС.1.1.0009.18 [8] формул пересчета и рекомендуемых для использования в них констант полученное отсутствие заметных изменений в течение 6–12 сут при «ускоренном старении» соответствует не более 190 сут срока годности при 21 °C (естественное хранение лекарственных препаратов в условиях умеренного климата), а срок годности в 2 года может быть обеспечен при хранении при температуре не выше 6 °C. Таким образом, согласно полученным данным, для хранения композиций ресвератрола с солюбилизаторами и лекарственных препаратов на их основе

должен применяться режим с пониженной температурой, который может быть соблюден при хранении в холодильнике.

Влияние добавления предполагаемых стабилизаторов на устойчивость ресвератрола в композициях в процессе хранения оказалось невыраженным. Все композиции сразу после приготовления не имели цвета, или цвет был характерен для входящих в их состав компонентов. Однако в процессе хранения все образцы приобрели заметный коричневый цвет. Композиции ресвератрола с P407 и T80 без добавления стабилизирующих добавок приобрели наиболее интенсивный коричневый цвет. При этом отсутствие стабилизирующих добавок в композиции ресвератрола с CD таким отличием не сопровождалось. Между композициями с лимонной или аскорбиновой кислотами и без них в промежуточные сроки в конце эксперимента (24-е сутки) определяемое содержание ресвератрола в данных пробах значимо не отличалось. Но наименьшая интенсивность цвета была отмечена у композиций с 2,5 % аскорбиновой кислоты. Таким образом, эксперимент с «ускоренным старением» подтвердил то, что наличие определенного количества аскорбиновой кислоты способствует подавлению процессов, приводящих к приобретению цвета композициями ресвератрола с солюбилизаторами, и ее целесообразно использовать для поддержания показателей качества этих композиций.

Исследования устойчивости ресвератрола в водных растворах композиций (рис. 4) дали следующие результаты: при низких pH, присущих желудочной среде, независимо от состава композиции его содержание в растворе практически не меняется в течение более чем 2 сут. А в водных растворах с кислотностью, близкой к нейтральной (т.е. аналогично среде кишечного сока), устойчивость ресвератрола хуже. Особенно

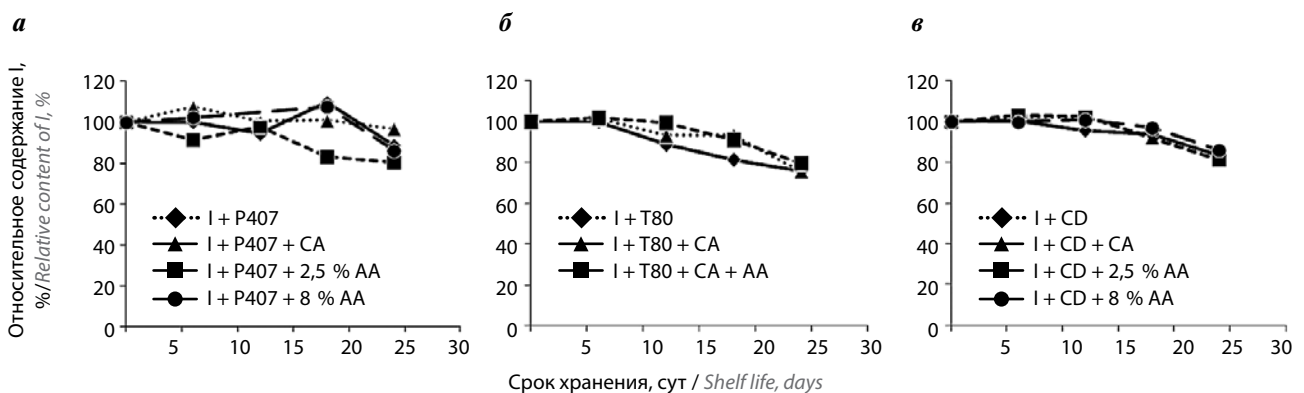


Рис. 3. Влияние хранения в условиях «ускоренного старения» (51 °C) на содержание ресвератрола (I) в композициях с солюбилизаторами: а – композиции с P407; б – композиции с T80; в – композиции с CD. На оси ординат отражено относительное содержание ресвератрола к его содержанию, измеренному сразу после приготовления композиций

Fig. 3. Effect of storage under conditions of accelerated aging (51 °C) on the content of resveratrol (I) in compositions with solubilizers: а – compositions with P407; б – compositions with T80; в – compositions from CD. The Y-axis shows the relative content of resveratrol to its content measured immediately after preparation of the compositions

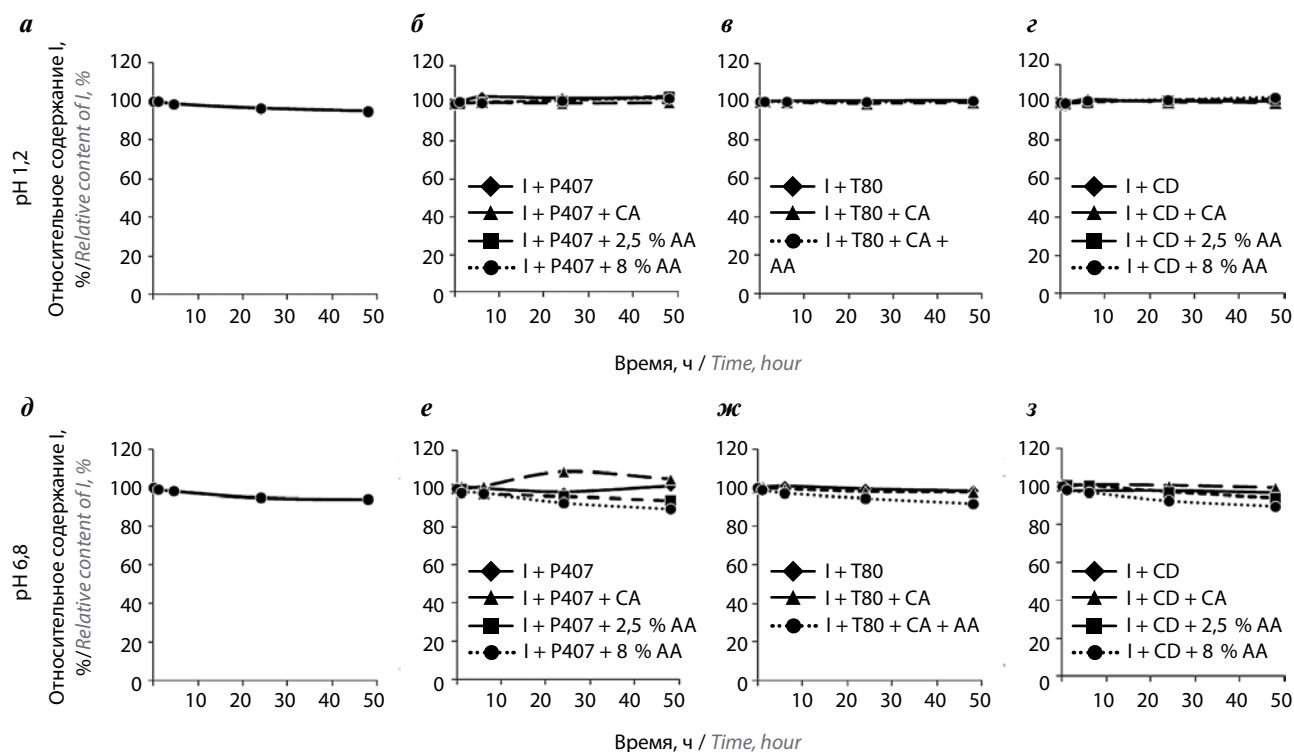


Рис. 4. Устойчивость ресвератрола (I) в водных растворах с pH разных отделов желудочно-кишечного тракта после растворения композиций ресвератрола с солюбилизаторами: а, д – чистый ресвератрол; б, е – композиции с P407; в, ж – композиции с T80; г, з – композиции с CD. На оси ординат отражено относительное содержание ресвератрола к его содержанию, измеренному сразу после приготовления раствора

Fig. 4. Stability of resveratrol (I) in aqueous solutions with pH of different parts of the gastrointestinal tract after dissolution of compositions resveratrol with solubilizers: а, д – pure resveratrol; б, е – composition with P407; в, ж – composition with T80; г, з – composition from CD. The Y-axis shows the relative content immediately to its content measured after the decision

заметно снижается содержание ресвератрола в присутствии аскорбиновой кислоты, опускаясь через 2 сут до 90 % от исходного уровня в случае композиций с 8 % этого ингредиента.

Продемонстрированная высокая стабильность солюбилизированного ресвератрола в кислой среде указывает на то, что при разработке лекарственных средств на основе его композиций с солюбилизаторами целесообразно ориентироваться на использование лекарственных форм, способствующих максимальному всасыванию ресвератрола в желудке. Последнее особенно важно при использовании в качестве солюбилизатора P407, растворение композиций ресвератрола с которым происходит медленно.

Заключение

В целом проведенные исследования композиций ресвератрола с солюбилизаторами показали возможность существенного повышения содержания ресвератрола в водных растворах при растворении его композиций с солюбилизаторами, образующими как мицеллы (P407, T80), так и комплексы включения (CD). При этом исходя из оптимального соотноше-

ния, определяемого молярным коэффициентом солюбилизации [4], 10 % содержания ресвератрола в композициях обеспечивает полный переход ФС в раствор. В этом случае максимальные концентрации ресвератрола, которые могут быть достигнуты в растворе, определяются главным образом растворимостью в воде солюбилизатора. Использование в композициях ресвератрола с солюбилизаторами в качестве стабилизирующих добавок органических кислот, образующих хелатные соединения с металлами или обладающих восстановительной способностью, не выявило их существенного влияния на устойчивость ресвератрола при хранении композиций и в растворах композиций. Однако добавление некоторого количества восстановителя способствует подавлению образования окрашенных продуктов при изготовлении и хранении композиций. Высокая устойчивость ресвератрола при низких pH растворов его композиций с солюбилизаторами указывает на целесообразность использования этих композиций в пероральных лекарственных формах, способствующих усвоению в желудке, например таблеток с быстрой распадаемостью или предварительно диспергируемых перед употреблением.

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

1. Van Hoogevest P., Liu X., Fahr A. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs: the industrial perspective. *Expert Opin Drug Deliv* 2011;8(11):1481–500. DOI: 10.1517/17425247.2011.614228
2. Meng F., Gala U., Chauhan H. Classification of solid dispersions: correlation to (i) stability and solubility (ii) preparation and characterization techniques. *Drug Dev Ind Pharm* 2015;41(9):1401–15. DOI: 10.3109/03639045.2015.1018274
3. Vo C.L.N., Park C., Lee B.J. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. *Eur J Pharm Biopharm* 2013;85(3 Pt B):799–813. DOI: 10.1016/j.ejpb.2013.09.007
4. Кречетов С.П., Масленникова М.С., Соловьева Н.Л., Краснюк И.И. Обоснование оптимального состава композиций ресвератрола с солюбилизаторами. *Российский биотерапевтический журнал* 2021;20(3):57–65. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-57-65
5. Krechetov S.P., Maslennikova M.S., Solovieva N.L., Krasnyuk I.I. Development of optimal composition formulation of resveratrol and solubilisers. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2021;20(3):57–65. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-57-65
6. Socol C.R., Vandenberghe L.P.S., Rodrigues C., Pandey A. New perspectives for citric acid production and application. *Food Technol Biotechnol* 2006;44(2):141–9.
7. Du J., Cullen J.J., Buettner G.R. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta* 2012;1826(2):443–57. DOI: 10.1016/j.bbcan.2012.06.003
8. Robinson K., Mock C., Liang D. Pre-formulation studies of resveratrol. *Drug Dev Ind Pharm* 2015;41(9):1464–9. DOI: 10.3109/03639045.2014.958753
9. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Доступно по: <https://base.garant.ru/72230404/>. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV edn. Available at: <https://base.garant.ru/72230404/>. (In Russ.).

Вклад авторов

С.П. Кречетов, М.С. Масленникова: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста статьи, редактирование статьи;

А.Ю. Куксин, А.Д. Малинкин: получение данных для анализа, анализ полученных данных;

Н.Л. Соловьева: разработка дизайна исследований, обзор публикаций по теме статьи;

И.И. Краснюк: разработка дизайна исследования.

Author's contributions:

S.P. Krechetov, M.S. Maslennikova: research design development, review of publications on the topic of the article, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, article writing and editing;

A.Yu. Kuksin, A.D. Malinkin: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;

N.L. Solovyova: research design development; review of publications on the topic of the article;

I.I. Krasnyuk: research design development.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.П. Кречетов / S.P. Krechetov: <https://orcid.org/0000-0003-2861-6010>

М.С. Масленникова / M.S. Maslennikova: <https://orcid.org/0000-0002-6416-7091>

А.Д. Малинкин / A.D. Malinkin: <https://orcid.org/0000-0002-0370-4500>

Н.Л. Соловьева / N.L. Solovieva: <https://orcid.org/0000-0002-0781-7553>

И.И. Краснюк / I.I. Krasnyuk: <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (договор № 02.G25.31.0001) в рамках реализации Постановления Правительства Российской Федерации от 09.04.2010 № 218.

Funding. This work was financially supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (contract No. 02.G25.31.0001) within the framework of the implementation of the Government Decree of the Russian Federation of 09.04.2010 No. 218.

Статья поступила: 28.12.2022. **Принята к публикации:** 18.02.2023.

Article received: 28.12.2022. **Accepted for publication:** 18.02.2023.



К 70-летию Александра Викторовича КАРАУЛОВА

To the 70th anniversary of Alexander Viktorovich KARAULOV

11 мая 2023 года исполнилось 70 лет Александру Викторовичу Караулову – доктору медицинских наук, профессору, академику РАН, заведующему кафедрой клинической иммунологии и аллергологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Минздрава России.

Вся научная деятельность А.В. Караулова связана с иммунологией. Он получил классическое образование в области медицины, выбрав иммунологию своей специальностью, окончил аспирантуру во Всесоюзном онкологическом научном центре АМН СССР и защитил последовательно кандидатскую (1979 г.) и докторскую диссертации (1988 г.). В 1988 году был назначен заместителем директора Института иммунологии по научной работе. Одновременно Александр Викторович руководил популяционными исследованиями в рамках программы Всесоюзного научного центра молекулярной диагностики и лечения, являясь главным научным сотрудником и директором одного из институтов в этом центре. В 1990 году А.В. Караулов стал инициатором создания кафедры клинической иммунологии и аллергологии в Первом МГМУ им. И.М. Сеченова, которой заведует по настоящее время. В 2018 году организовал международную лабораторию иммунопатологии в рамках проектов по повышению конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров «5–100» и программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030».

Уже в первых научных исследованиях А.В. Караулова были выявлены био-

логические характеристики различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток, что позволило создать и внедрить оригинальную методологию оценки состояния иммунной системы человека и животных. В дальнейшем им получены новые данные о регуляции иммунных реакций в норме и при патологии человека, установлены новые клеточные и молекулярные механизмы развития иммунологических нарушений и показаны возможности их коррекции. Работы А.В. Караулова в последние два десятилетия посвящены исследованию механизмов мукозального иммунитета респираторного и урогенитального трактов, изучению иммунорегуляторной роли растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы человека и созданию инновационных технологий диагностики, профилактики и лечения иммунозависимых и аллергических заболеваний.

Александр Викторович активно участвовал в реализации научно-технического сотрудничества с ведущими биомедицинскими центрами, работал в Институте Пастера в Париже в рамках программы ЮНЕСКО «Человек против вируса» и в Тропическом центре. Он успешно окончил Гарвардские курсы по менеджменту биомедицинских исследований, курсы ВОЗ по клиническим исследованиям, являлся

активным участником и приглашенным лектором на международных форумах, школах и семинарах по иммунологии и аллергологии, редактировал международные журналы «Медикал Маркет» и «Практикующий врач». В настоящее время является членом редколлегий ряда отечественных и международных журналов, в том числе заместителем главного редактора «Российского биотерапевтического журнала» с момента его основания.

А.В. Караулов проявил себя как активный ученый и педагог: он соавтор первых в России учебников, атласов и учебных пособий по клинической иммунологии и аллергологии, 30 монографий и книг, 14 патентов и двух открытий. Под его руководством защищены 19 докторских и 30 кандидатских диссертаций, он руководит научной школой по иммунологии, отмеченной Советом по грантам Президента РФ, грантом Сеченовского Университета и грантом РНФ на проведение исследований научными лабораториями мирового уровня.

Александр Викторович является победителем открытого конкурса Совета ректоров медицинских вузов страны «Лучший преподаватель медицинского вуза» в номинации «За подготовку научно-педагогических кадров» и награжден ежегодной премией в сфере медицинского

и фармацевтического образования в номинации «За лучшее учебное издание в 2015 году».

А.В. Караулов – заместитель председателя специализированного диссертационного совета, на протяжении многих лет – председатель Экспертного совета по медико-профилактическим наукам ВАК РФ, в настоящее время – член Президиума ВАК РФ. Александр Викторович является заместителем руководителя секции медико-биологических наук Отделения медицинских наук РАН, экспертом РАН, РНФ, Минобрнауки, членом секции по присуждению премий Правительства РФ в области науки и техники. На протяжении многих лет работал в качестве главного внештатного специалиста по клинической иммунологии и аллергологии Третьего главного управления при Минздраве СССР, Медицинского центра АН СССР, консуль-

тантом 4-го Главного управления при Минздраве СССР, Медицинского центра Управления делами Президента РФ и научным руководителем ЦКБ 4-го Главного управления при Минздраве РСФСР.

А.В. Караулов – председатель комиссии здравоохранения Российской ассоциации содействия ООН. В качестве советника и эксперта А.В. Караулов входил в состав российских делегаций на исполкомах, генассамблеях, в комитетах ВОЗ. Он активно участвует в работе международных форумов и съездов, был представителем стран Восточной Европы в комитете ВОЗ/ЮНФПА/ЮНИСЕФ. Александр Викторович Караулов является почетным профессором ряда университетов, отмечен высшим знаком Первого МГМУ им. И.М. Сеченова «За заслуги перед Первым МГМУ им. И.М. Сеченова», удостоен звания «Заслуженный профессор Сече-

новского Университета», имеет ведомственные награды («Отличник здравоохранения», «За заслуги перед отечественным здравоохранением»), грамоты Минздрава, РАМН, РАН, ВАК РФ, а также медали и дипломы общественных академий и научных обществ.

Научные заслуги Александра Викторовича Караулова были отмечены на государственном уровне рядом правительственных наград, в числе которых медаль ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени, орден Почета, звание «Заслуженный деятель науки РФ», медаль «850 лет Москвы». А.В. Караулов – лауреат премии Москвы в области медицины (2009 г.), премии Правительства Российской Федерации в области образования (2012 г.), премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники (2017 г.), премии имени И.И. Мечникова РАН (2020 г.).

Редакционная коллегия «Российского биотерапевтического журнала»
поздравляет Александра Викторовича с юбилеем и желает ему здоровья, благополучия
и дальнейших творческих успехов!