

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



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

2023 • ТОМ 22 • №1

Российский Биотерапевтический Журнал



**Russian Journal
of Biotherapy**

1

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

1
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: Т.Н. Помилуйко,
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. № 1. 1–84.
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2023

Подписной индекс в каталоге агентства
«Роспечать» – 81679.

Отпечатано в типографии «Мэйл Текнолоджи».
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

1 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
rjournal@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: T.N. Pomiluyko, 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 1. 1–84.
© PH "ABV-Press", 2023
Rospechat' catalogue index: 81679.
Printed at the Mail Technology 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.А. Рудакова, А.Д. Ширин, Н.В. Голубцова, М.В. Пинюгина, В.А. Мисюрин*
Профиль экспрессии гена и белка GAGE у больных онкологическими заболеваниями 10
- П.М. Соколов, А.В. Караулов, А.В. Суханова, И.Р. Набиев*
Биомаркеры опухолевого микроокружения при раке молочной железы 19
- С.В. Тишков, Е.В. Блынская, К.В. Алексеев, В.К. Алексеев*
Особенности методов анализа, оценки и контроля рисков в фармацевтической разработке 28

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- А.М. Казаков, К.К. Лактионов, К.А. Саранцева*
Генетический профиль пациентов с немелкоклеточным раком легкого I—III стадий 42
- С.В. Чулкова, Е.Н. Шолохова, И.В. Поддубная, И.С. Стилиди, А.В. Егорова, Н.А. Козлов, Н.Н. Тупицын*
Взаимосвязь лимфоидных популяций (инфильтрации) первичной опухоли с иммунными реакциями в костном мозге у больных раком молочной железы 49
- В.Н. Блиндарь, М.М. Добровольская, Г.Н. Зубрихина, Т.В. Давыдова*
Анемический синдром, ассоциированный со злокачественными новообразованиями, у больных колоректальным раком 62
- Г.О. Нифонтова, Д.В. Калениченко, М.А. Барышникова, З.А. Соколова, П.С. Самохвалов, А.В. Караулов, А.В. Суханова, И.Р. Набиев*
Нанозонды на основе флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов и однодоменных антител для высокочувствительной детекции рецептора эпидермального фактора роста в опухолевых клетках 68
- В.В. Токаев, Э.Ф. Степанова, М.С. Макиева, Ю.А. Морозов, Д.И. Поздняков, Д.И. Гаглоева*
Фармацевтическая разработка для трансдермальных лекарственных форм нифедипина: обоснование выбора и специфичность действия 76

ЮБИЛЕЙ

- К 100-летию академика Анатолия Андреевича Воробьева (05.02.1923—23.03.2006)** 82

REVIEWS

<i>Anna A. Rudakova, Anton D. Shirin, Natalia V. Golubtsova, Marina V. Pinyugina, Vsevolod A. Misyurin</i>	
GAGE gene and protein expression profile in cancer patients	10
<i>Pavel M. Sokolov, Alexander V. Karaulov, Alyona V. Sukhanova, Igor R. Nabiev</i>	
Tumor microenvironment biomarkers in breast cancer	19
<i>Sergey V. Tishkov, Evgenia V. Blynskaya, Konstantin V. Alekseev, Viktor K. Alekseev</i>	
Features of risk analysis, assessment and control methods in pharmaceutical development	28

ORIGINAL REPORTS

<i>Alexey M. Kazakov, Konstantin K. Laktionov, Ksenia A. Sarantseva</i>	
Genetic profile of patients with stage I–IIIA non-small cell lung cancer	42
<i>Svetlana V. Chulkova, Elena N. Sholokhova, Irina V. Poddubnaya, Ivan S. Stylydi, Angelina V. Egorova, Nikolay A. Kozlov, Nikolai N. Tupitsyn</i>	
The relationship of lymphoid populations (infiltration) of the primary tumor with bone marrow immune responses in patients with breast cancer	49
<i>Valentina N. Blindar, Marina M. Dobrovolskaya, Galina N. Zubrikhina, Tatiana V. Davydova</i>	
Anemia syndrome associated with malignant neoplasms in patients with colorectal cancer	62
<i>Galina O. Nifontova, Daria V. Kalenichenko, Maria A. Baryshnikova, Zinaida A. Sokolova, Pavel S. Samokhvalov, Alexander V. Karaulov, Alyona V. Sukhanova, Igor R. Nabiev</i>	
Nanoprobes based on fluorescent semiconductor nanocrystals and single-domain antibodies for highly sensitive detection of epidermal growth factor receptor in tumor cells	68
<i>Vadim V. Tokaev, Eleonora F. Stepanova, Marina S. Makieva, Yuri A. Morozov, Dmitry I. Pozdnyakov, Diana I. Gagloeva</i>	
Pharmaceutical development for transdermal dosage forms of nifedipine: justification of the choice and specificity of the action	76

JUBILEE

To the 100th anniversary of the academician Anatoliy Andreevich Vorobyov (05.02.1923–23.03.2006)	82
--	-----------

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-1-10-18>

Профиль экспрессии гена и белка GAGE у больных онкологическими заболеваниями

А.А. Рудакова, А.Д. Ширин, Н.В. Голубцова, М.В. Пинюгина, В.А. Мисюрин

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115552 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анна Андреевна Рудакова rudakovaan93@yandex.ru

Раково-тестикулярные антигены (РТА) – антигены, экспрессируемые клетками опухолей различных гистологических типов, но практически отсутствующие в клетках нормальных тканей, за исключением половых клеток. К РТА относят более 100 белков, большинство из которых объединены в большие семейства. В настоящее время использование РТА в целях иммунотерапии при лечении онкологических заболеваний было протестировано во многих исследованиях, и для многих случаев достигнуто увеличение времени выживаемости. Поэтому они могут являться перспективными мишенями для создания противоопухолевых препаратов, таргетной терапии опухолей и в качестве диагностических биомаркеров.

Целью настоящего обзора стало изучение семейства антигенов GAGE – одной из групп РТА, распознающихся Т-клетками. Белки этого семейства, экспрессируясь в клетках опухоли, стимулируют развитие гуморального и клеточного иммунного ответа против них. Из этого следует, что они вполне соответствуют требованиям, предъявляемым к мишеням для иммунотерапии опухолей.

В обзоре представлены сведения о структуре и последовательности генов, кодирующих белки семейства GAGE. Подробно рассмотрены вопросы о роли GAGE в апоптозе и приведены результаты исследований, доказывающие, что GAGE-7С делает клетки устойчивыми к апоптозу, опосредованному интерфероном γ или Fas. Рассмотрены результаты клинических исследований экспрессии генов и белков группы GAGE при различных видах опухолевых заболеваний и приведены примеры выявленной корреляции между экспрессией GAGE и плохим прогнозом при некоторых видах рака.

Таким образом, белки группы GAGE при детальном исследовании могут стать возможным диагностическим и прогностическим маркером раковых заболеваний и в дальнейшем использоваться для оценки злокачественности и мониторинга опухолей для подбора тактики лечения.

Ключевые слова: GAGE, раково-тестикулярные антигены, экспрессия генов и белков

Для цитирования: Рудакова А.А., Ширин А.Д., Голубцова Н.В. и др. Профиль экспрессии гена и белка GAGE у больных онкологическими заболеваниями. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(1):10–8. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-10-18

GAGE gene and protein expression profile in cancer patients

Anna A. Rudakova, Anton D. Shirin, Natalia V. Golubtsova, Marina V. Pinyugina, Vsevolod A. Misyurin

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

Contacts: Anna Andreevna Rudakova rudakovaan93@yandex.ru

Cancer-testis antigens (CTA) are antigens expressed by tumor cells of various histological types, but practically absent in cells of normal tissues, with the exception of germ cells. CTA includes more than 100 proteins, most of which are grouped into large families. Currently, the use of CTA for immunotherapy in the treatment of oncological diseases has been tested in many studies, and an increase in survival time has been achieved for many cases. Therefore, they can be promising targets for the creation of antitumor drugs, targeted therapy of tumors and as diagnostic biomarkers.

The purpose of this review was to study the GAGE family of antigens, one of the CTA groups recognized by T cells. Proteins of this family, expressed in tumor cells, stimulate the development of a humoral and cellular immune response against them. It follows from this that they fully meet the requirements for targets for tumor immunotherapy.

The review provides information about the structure and sequence of genes encoding proteins of the GAGE family. The question of the role of GAGE in apoptosis is considered in detail and the results of studies proving that GAGE-7C makes cells resistant to apoptosis mediated by interferon γ or Fas are presented. The results of clinical studies of the expression of GAGE group genes and proteins in various types of tumor diseases are considered and examples of the reported correlation between GAGE expression and poor prognosis in some types of cancer are given. Thus, the proteins of the GAGE group, with a detailed study, can become a possible diagnostic and prognostic marker of cancer diseases, and in the future be used to assess malignancy and monitor tumors for the selection of treatment tactics.

Keywords: GAGE, cancer-testis antigens, gene and protein expression

For citation: Rudakova A.A., Shirin A.D., Golubtsova N.V. et al. GAGE gene and protein expression profile in cancer patients. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2023;22(1):10–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-10-18

Раково-тестикулярные антигены в качестве мишени для иммунотерапии

Один из основных механизмов, опосредующих эффективность иммунотерапии, заключается в успешности привлечения Т-клеток к клеткам опухоли. Для проведения подобной реакции опухоль должна иметь антигены, отличающие ее от нормальных клеток. Подобные антигены известны как опухлеассоциированные антигены, частным случаем которых являются раково-тестикулярные антигены (РТА).

Первоначально РТА описали на основании тканевой локализации их паттерна экспрессии. В настоящее время к РТА относят более 100 белков, большинство из которых объединены в большие семейства, и кодирующие их гены находятся на хромосоме X. Гены собраны в кластеры, претерпевшие быструю эволюцию в основном из-за того, что они постоянно подвергались положительному отбору [1]. Остальные, не-X-хромосомные антигены, находятся в аутосомах, зачастую в единственной копии. РТА являются потенциальными молекулами для разработки методов опухолиспецифической иммунотерапии, направленной против них, поскольку Т-клетки успешно их распознают.

Раково-тестикулярные антигены экспрессируются во многих гистологических вариантах опухолей и при этом не встречаются в здоровых тканях, за исключением половых клеток, которые являются иммунопривилегированными из-за отсутствия или очень низкого уровня экспрессии молекул системы HLA [2–5]. Кроме того, против некоторых РТА естественным образом развивается клеточный и гуморальный иммунный ответ, что указывает на возможность создания вакцины против них в целях развития новых способов иммунотерапии [6–15]. Использование РТА в целях иммунотерапии при лечении онкологических заболеваний было протестировано во многих исследованиях, и для многих случаев достигнуто увеличение времени выживаемости [16, 17]. Таким образом, РТА являются перспективными мишенями как для создания таргетных противоопухо-

левых препаратов, так и в качестве диагностических биомаркеров.

Целью настоящего обзора стало изучение семейства антигенов GAGE – одной из групп РТА, которые экспрессируются в клетках опухоли и стимулируют развитие гуморального и клеточного иммунного ответа против них. При работе над данным обзором был проведен поиск литературы по ключевым словам «GAGE семейство белков», «GAGE опухоли», «GAGE иммунотерапия», «GAGE1», «GAGE immunotherapy», «GAGE cancer-testis protein» и «GAGE cancer» в поисковой системе Google и базе данных PubMed. Охвачен период с 1997 по 2022 г. Найдено и проанализировано 64 источника литературы, часть из которых не включена в настоящий обзор ввиду недостаточно глубокого рассмотрения особенностей белков группы GAGE либо отсутствия новых данных.

Гены группы GAGE

Одной из групп РТА, распознающихся Т-клетками, является семейство антигенов GAGE. Семейство было первоначально идентифицировано по реакции иммунного распознавания аутологичными цитотоксическими Т-лимфоцитами антигенов, представленных молекулами HLA-Cw6 и HLA-A29 на поверхности клеток меланомы человека [18, 19].

Семейство РТА GAGE включает небольшие белки, имеющие отрицательный заряд поверхности. Для всех этих белков предсказано высокое сходство их аминокислотных последовательностей. Кодируемые белки участвуют в развитии половых клеток. Экспрессируясь в клетках опухоли, белки GAGE стимулируют развитие гуморального и клеточного иммунного ответа против них. Из этого следует, что они вполне соответствуют требованиям, предъявляемым к мишеням для иммунотерапии опухолей.

Последовательности генов, кодирующие белки семейства GAGE, расположены в равном числе tandemных повторов на хромосоме X (область p11.2–p11.4). В этом локусе обнаружено по меньшей мере

16 гомологичных друг другу генов. Высокое сходство последовательностей генов семейства *GAGE*, а также их равномерное распределение в локусе позволяют предположить, что это семейство возникло в результате дубликации предкового гена *GAGE*, причем это произошло относительно недавно в истории развития приматов. Это подтверждается тем, что не удалось найти аналоги *GAGE* в геноме хомяка или мыши. Поиск с использованием ресурса BLAST позволяет найти это семейство только у человека и шимпанзе. Отсюда следует, что только приматы имеют в своем геноме информацию о генах семейства *GAGE* [20].

Отдельные представители данного семейства получили название и объединены в группы в соответствии со следующими вариациями: 109_111insTAT, 112T>C и 136C>G, которые приводят к различиям в полипептидных последовательностях Y9del, W11R и Q19E и могут быть важны для функции белка. Эта аннотация разделяет гены на следующие группы: *GAGE1* (повтор 1) (без вставки L1, без 109_111insTAT, 112C, 136G), *GAGE2A–E* (повторы 2, 9, 10, 12, 13) (без 109_111insTAT, 112C, 136G), *GAGE10* (повтор 16) (нет 109_111insTAT, 112T, 136G), *GAGE12C–J* (повторы 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11 и 15) (109_111insTAT, 112T, 136C) и *GAGE13* (повтор 14) (109_111insTAT, 112C, 136G). Система классифицирует участников по основным структурным группам и позволяет аннотировать новых членов по мере их открытия. Вероятно, что 2 гена, *GAGE13* и *GAGE10*, могли произойти путем дубликации генов *GAGE2* и *GAGE12*, в то время как *GAGE1*, единственный ген, в котором отсутствует вставка L1, скорее всего, является общим предком всей группы генов. Три из новых генов *GAGE* (*GAGE10*, *GAGE12J* и *GAGE13*) кодируют варианты ранее идентифицированных антигенных пептидов HLA-Cw6 и HLA-A29 и могут быть использованы для разработки вакцины [20].

Функции белков группы GAGE

Функции белков *GAGE* в целом остаются неустановленными, но известно, что они проявляются в форме устойчивости клеток к апоптозу [21]. В исследованиях ученых из Иллинойского университета в Чикаго изучалась роль *GAGE-7C* в двух аспектах онкогенеза, а именно устойчивости к апоптозу и проводимой противоопухолевой терапии [21]. Они исследовали роль *GAGE* в апоптозе, поскольку хорошо известно, что апоптоз играет важную роль в прогрессировании при некоторых типах опухолей [22]. Кроме того, повышенная экспрессия антиапоптотических генов, таких как *Bcl-2*, сурвивин и *Hsp70*, связана с онкогенностью [23]. Как было установлено, *GAGE-7C* делает клетки устойчивыми к апоптозу, опосредованному интерфероном γ (IFN- γ) или Fas. Кроме того, показано, что *GAGE* делает клетки устой-

чивыми к таксолу и γ -облучению. В целом наблюдаемая экспрессия *GAGE-7C* в широком спектре опухолей человека по меньшей мере частично обусловлена его антиапоптотической активностью, и устойчивость к различным лекарственным воздействиям может объяснить выявленную корреляцию между экспрессией *GAGE* и плохим прогнозом при некоторых видах рака.

Для определения роли *GAGE* в апоптозе, индуцированном IFN- γ , были использованы 2 пула трансфицированных клеток *GAGE-7C*, а также контрольных трансфицированных клеток. Все эти клетки обрабатывали цитокином в течение 2 нед. Для оценки выживаемости клеток проводилось определение способности образования ими колоний [21]. В то время как контрольные трансфицированные клетки погибли в присутствии IFN- γ , *GAGE-7C*-трансфицированные клетки пролиферировали и образовывали видимые колонии. Таким образом, *GAGE-7C* делает клетки HeLa устойчивыми к IFN- γ -индуцированному апоптозу.

Может ли *GAGE-7C* защищать клетки от апоптоза, опосредованного активацией белка Fas, значимого проапоптотического рецептора? Два пула трансфицированных *GAGE-7C* клеток обрабатывали агонистическим анти-Fas-антителом. Апоптоз определяли путем окрашивания DAPI и подсчета фракции клеток, содержащих конденсированные и/или фрагментированные хромосомы. После 90 ч обработки 99 % контрольных трансфицированных клеток были в стадии апоптоза, в то время как трансфицированные *GAGE-7C* клетки были значительно более устойчивыми к Fas-индуцированному уничтожению, в результате чего наблюдалось только 41,5 и 42,3 % апоптотических клеток. Таким образом, антиапоптотическая активность *GAGE* проявляется не только при воздействии IFN- γ , но также посредством блокирования сигнального пути Fas.

Устойчивость к Fas-индуцированному апоптозу поставила перед исследователями интересный вопрос: устойчивы ли клетки к апоптозу, но при этом замедляют рост, или же они устойчивы к апоптотическому стимулу и могут размножаться после его удаления? Чтобы различить 2 возможности, 2 пула клеток *GAGE-7C* и 2 пула контрольных клеток обрабатывали антителом против Fas. В тот момент, когда каждая из контрольных популяций находилась в стадии апоптоза на 95 %, а каждая из популяций *GAGE-7C* была апоптотической только на 34 %, выжившие клетки *GAGE-7C* промывали, трипсинизировали, подсчитывали, пересеивали и выращивали при отсутствии анти-Fas антитела в течение 5 дней. Необработанные клетки *GAGE-7C* высевали с одинаковой плотностью. Клетки, трансфицированные *GAGE-7C*, которые выжили после обработки антителом против

Fas, демонстрировали сходное количество митозов по сравнению с клетками, которые не обрабатывали антителом против Fas. Таким образом, клетки GAGE-7C, которые выживают после апоптотического стимула, не склонны к гибели и способны к устойчивой пролиферации.

Данные эксперименты показали, что GAGE-7C делает клетки устойчивыми к апоптозу, вызванному 2 различными рецепторами клеточной поверхности, — рецепторами IFN- γ и Fas. Поскольку в настоящее время характеристика пути IFN- γ -киллинга является неполной, было сделано предположение, что антиапоптотическая активность GAGE проявляется «ниже по течению» от точки схождения 2 сигнальных путей. Эта активность не является уникальной для GAGE-7C, поскольку GAGE-7/7B также придает устойчивость к апоптозу, вызванному Fas. В будущем предстоит определить, является ли это свойство общим для всех членов семьи GAGE [21].

Z.M. Cilensek и соавт. задались вопросом, влияют ли GAGE-7C на устойчивость клеток к химиотерапии, проверив чувствительность трансфицированных GAGE-7C клеток к таксолу (паклитакселу) — цитотоксическому агенту, стабилизирующему микротрубочки. Клетки обрабатывали 5 нг/мл (5,8 нМ) или 10 нг/мл (11,7 нМ) таксола. После 30 ч обработки определяли способность клеток к пролиферации методом анализа образования колоний. Как при воздействии 5 нг/мл, так и при воздействии 10 нг/мл таксола контрольные трансфицированные клетки были убиты достаточно эффективно, в то время как трансфицированные GAGE-7C клетки образовывали видимые колонии. Микроскопическое исследование клеток, обработанных 5 нг/мл таксола, выявило большие, активно пролиферирующие колонии в трансфектантах GAGE-7C. При этом практически не обнаруживались клетки с aberrантной морфологией [21].

Чтобы исследовать роль GAGE-7C в ответе на ионизирующее излучение, клетки, трансфицированные GAGE-7C, обрабатывали различными дозами γ -облучения, реплицировали при низкой плотности, и колонии подсчитывали через 8 дней. Трансфицированные GAGE клетки демонстрировали повышенную радиационную выживаемость, обнаруживаемую при дозах 4 Гр и выше, достигая 4-кратной разницы по сравнению с контрольными клетками при 10 Гр. Следовательно, GAGE-7C делает клетки устойчивыми к γ -облучению, что подтверждается анализом образования колоний.

Активность GAGE-7C может способствовать прогрессии опухоли, позволяя опухолевым клеткам избегать апоптоза *in vivo*, включая опосредованное Т-клетками уничтожение через Fas-рецептор. Эта гипотеза подтверждается выводами о том, что выжив-

шие клетки GAGE-7C активно пролиферируют и демонстрируют повышенную долговременную выживаемость после лечения IFN- γ , γ -облучением или таксолом. Поскольку клетки GAGE растут со скоростью, неотличимой от скорости роста контрольных клеток, был сделан вывод, что устойчивость к 2 различным противораковым агентам, а именно γ -излучению и таксолу, не является результатом стимулирующей рост активности GAGE-7C. Полученные данные указывают на то, что устойчивость к радиации или таксолу можно отнести только отчасти к способности опухолевых клеток подвергаться апоптозу в зависимости от режима лечения, статуса p53 и происхождения опухоли [24, 25]. Поэтому пока не ясно, связана ли устойчивость к γ -облучению и таксолу, обусловленная GAGE-7C, с наблюдаемой устойчивостью к апоптозу, опосредованному рецептором, или же GAGE-7C играет роль в клетках различного гистологического происхождения.

В целом полученные результаты определяют функциональную связь между GAGE-7C и 2 аспектами прогрессирования опухоли человека: устойчивостью к Fas-индуцированному апоптозу и устойчивостью к химио- и радиотерапевтическим агентам. Более того, устойчивость к клинически значимым агентам может объяснить корреляцию между экспрессией GAGE и плохим прогнозом [12].

Таким образом, GAGE является привлекательной мишенью для лечения рака. Его инактивация у людей едва ли будет иметь пагубные последствия, в то время как он может повышать чувствительность опухолей к таксолу и γ -облучению и восстанавливать клеточный ответ на апоптотические стимулы. Дальнейшее выяснение молекулярного механизма, лежащего в основе антиапоптотической функции белков GAGE, ускорит разработку специфических противораковых препаратов.

Причины экспрессии генов группы GAGE

Причины экспрессии данных генов в опухоли изучены относительно мало. Есть только отрывочные сведения о том, что при мезотелиоме экспрессия GAGE увеличивалась после использования азацитина.

В исследовании J.A. Tuxhorn и соавт. [26] показана прямая зависимость между активностью GAGEC1 и воздействием трансформирующего фактора роста β 1 (TGF- β 1) в первичных стромальных и эпителиальных клетках предстательной железы.

Для исследования опосредованной TGF- β 1 индукции GAGEC1 первичные эпителиальные клетки предстательной железы (PrEC), первичные стромальные фибробласты предстательной железы (PrSC) и первичные фибробласты крайней плоти (PFF) стимулировали 1 нг/мл TGF- β 1 в течение 24 ч. Все типы

клеток подверглись видимым морфологическим изменениям при стимуляции TGF- β 1, став увеличенными, уплощенными и менее преломляющими свет по сравнению с предшествующими результатами, полученными для трансдифференцированных PrSCs и PrECs [26].

При помощи гнездовой полимеразной цепной реакции (ПЦР) выявили значительную индукцию GAGEC1 в PrSC и PrEC по сравнению с контрольными клетками, обработанными bFGF. Хотя морфология PFF указывала на то, что трансдифференцировка происходила при обработке TGF- β 1, не было заметной индукции GAGEC1, несмотря на идентичные условия *ex vivo*, указывающие на то, что индукция GAGEC1 в PrECs и PrSCs является клеточно-специфическим ответом на TGF- β 1.

Учитывая, что уровень TGF- β 1 увеличивается при доброкачественной гиперплазии предстательной железы и раке поджелудочной железы, опосредованная TGF- β 1 индукция экспрессии GAGEC1 в первичных опухолях при данных заболеваниях предполагает возможный механизм, который может частично отвечать за активацию экспрессии GAGEC1. Кроме того, ядерно-цитоплазматическая локализация белка GAGEC1-E сходна с таковой у многих белков GAGE [27], что предполагает регуляцию экспрессии этих белков неким общим механизмом.

Результаты свидетельствуют о том, что увеличение уровня TGF- β 1, связанное с заболеванием, может объяснить увеличение экспрессии GAGEC1 при доброкачественной гиперплазии предстательной железы и раке предстательной железы.

Экспрессия генов и белков группы GAGE при различных видах опухолевых заболеваний

Транскрипты гена *GAGE* были обнаружены при многих видах рака, чаще всего при злокачественных меланомах (24–42 %) [28], раке легкого (19–54 %) [28], карциноме щитовидной железы (30 %) [29], раке молочной железы (26 %) [30], гепатоцеллюлярном раке (38 %) [31] и раке яичников (30 %) [32]. Иммуногистохимические исследования также выявили активность GAGE при нескольких видах рака, включая злокачественную меланому (17 %) и рак легкого (16 %), молочной железы (12 %) и щитовидной железы (10 %), но, как правило, с более низкой частотой, чем при исследовании методом ПЦР [33].

Экспрессия GAGE коррелирует с поздними стадиями рака легких и постепенно увеличивается по мере прогрессирования заболевания [34]. Экспрессию белка GAGE оценивали методом иммуногистохимии в 61 образце карциномы пищевода (40 аденокарцином и 21 образец плоскоклеточного рака), 50 образцах карциномы желудка и 141 образце колоректального

рака. Самая высокая частота экспрессии была обнаружена при плоскоклеточном раке пищевода: положительное окрашивание наблюдалось в 29 % случаев. Экспрессия белка GAGE при аденокарциноме пищевода наблюдалась в 2–24 % случаев и существенно не отличалась от экспрессии GAGE при разных типах аденокарциномы желудка [35].

В другой работе описывается экспрессия GAGE при раке щитовидной железы и показано, что она не связана с клиническим исходом. Для анализа были доступны данные 117 пациентов, перенесших хирургическое лечение по поводу заболевания щитовидной железы. Уровни экспрессии GAGE анализировали методом иммуногистохимии. Ни в нормальной щитовидной железе, ни в зобе GAGE не экспрессировался. При папиллярной и фолликулярной карциноме белок GAGE присутствовал в 10,8 % случаев, при медуллярной карциноме экспрессия антигена GAGE составила 92,9 %. В случаях плохо дифференцированной и анапластической карцином экспрессия GAGE составляла 66,7 %. Наблюдалась статистически значимая связь между экспрессией GAGE и полом ($p = 0,043$). Однако не было связи между экспрессией и выживаемостью пациентов ни при одном из проанализированных опухолевых образований. Текущее исследование выявило четкую картину экспрессии GAGE в злокачественных опухолях щитовидной железы, что указывает на то, что он потенциально превосходит существующие биомаркеры рака щитовидной железы [36].

Экспрессия генов семейства *GAGE* была обнаружена у 1/3 пациентов с множественной миеломой. Их экспрессия была идентифицирована как независимый прогностический фактор [37]. GAGE-4 и GAGE-8 представляют собой антигены с более высокой частотой экспрессии у пациентов с рецидивом множественной миеломы, чем при недавно диагностированном заболевании [38]. Было показано, что GAGE-1 и GAGE-12 сверхэкспрессируются у пациентов, у которых гены, участвующие в клеточном цикле и пролиферации, были сверхэкспрессированы, что подтверждает связь между генами РТА и прогнозом [39, 40]. В другом исследовании изучалась связь с прогнозом при множественной миеломе. Экспрессия генов семейства *GAGE* была изучена методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в 15 нормальных тканях, пуле из 10 нормальных образцов костного мозга, 3 нормальных миндалин и аспириатов костного мозга от 6 здоровых доноров, 3 моноклональных гаммапатий неопределенной значимости (MGU), 5 солитарных плазмцитом, 39 образцов множественной миеломы (95 % на поздней стадии) и линии клеток MMU266. Выявленная частота экспрессии GAGE у пациентов с множественной миеломой составляла 33 %. Регрессионная модель Кокса показала, что

экспрессия генов семейства *GAGE* была независимым прогностическим фактором при анализе всех пациентов. Обнаружено, что худший прогноз связан с экспрессией генов семейства *GAGE* [37].

Экспрессия мРНК гена *GAGE* была выявлена у 13 из 52 исследованных больных раком поджелудочной железы и у 1 из 8 больных с хроническим панкреатитом. Исследовались клетки поджелудочной железы, полученные методом биопсии. Наличие *GAGE* у больных хроническим панкреатитом позволяет рассматривать данное состояние как предрак [41].

Также изучалась экспрессия *GAGE* при опухолях желудочно-кишечного тракта. Анализ экспрессии *GAGE* проводили иммуногистохимическими методами. Из 51 доступного случая мужчин было 30 (59 %), а женщин – 21 (41 %); средний возраст 66 ± 15 лет (диапазон – 29–87 лет). Первичные очаги опухоли были следующими: желудок – 63 % (32/51) случаев, тонкая кишка – 35 % (18/51) случаев, другая локализация – 2 % (1/51) случаев. Все опухоли были иммуногистохимически положительны на антигены стволовых клеток CD117 и CD34. При раке желудка экспрессия *GAGE* связана с большим объемом опухоли и большей скоростью пролиферации. Экспрессия *GAGE* была обнаружена у 6 (12 %) из 51 пациента с раком желудка. Гастроинтестинальные стромальные опухоли с высокой степенью злокачественности с большей вероятностью экспрессируют *GAGE* ($p = 0,002$) по сравнению с менее агрессивными опухолями. Средний размер отрицательных и положительных по *GAGE* опухолей составил 4,0 и 8,0 см соответственно. Все пациенты с экспрессией *GAGE* имели умеренный или высокий риск рецидива в соответствии с установленными критериями риска. Наличие *GAGE* коррелирует со скоростью митоза ($p = 0,001$) и размером опухоли ($p = 0,02$), но не с локализацией опухоли ($p = 0,6$) [42].

У пациентов с хроническим панкреатитом РТА *GAGE-2* экспрессировались в 16 % (4/24) случаев, но гуморального иммунного ответа не наблюдалось. Несмотря на обнаружение мРНК *GAGE* у 1 из 9 пациентов с хроническим панкреатитом, не наблюдалось никакого гуморального иммунного ответа против *GAGE* в 15 образцах сыворотки, полученных от пациентов с хроническим панкреатитом [22].

Анализ экспрессии РТА с помощью ОТ-ПЦР и иммуногистохимии у больных медуллобластомой показал, что *GAGE* присутствует в 64 % (16/25) случаев [43]. При раке печени экспрессия происходит относительно редко. Методом иммуногистохимии исследовались образцы, полученные от 146 больных с гепатоцеллюлярной карциномой, 13 больных с внутривенной холангиокарциномой, 37 больных с внепеченочными холангиокарциномами и 32 больных с карциномой желчного пузыря. Из 146 гепато-

целлюлярных карцином белки группы *GAGE* обнаружены в 11 % случаев. Кроме того, экспрессия *GAGE* коррелировала со снижением общей выживаемости у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой ($p = 0,01$). Экспрессия белка *GAGE* обнаружена всего в 3 % случаев рака желчного пузыря. У больных с внутри- и внепеченочными холангиокарциномами экспрессии не выявлено [44].

Проводилась также иммуногистохимическая оценка экспрессии *GAGE* у 210 случайно выбранных первичных больных инвазивными видами рака молочной железы. Полученные данные были сопоставлены с клинико-патологическими параметрами и исходными данными, включая безрецидивную и общую выживаемость. Экспрессия *GAGE* была обнаружена в 17 (12,8 %) проанализированных случаях. Локализация *GAGE* была в основном цитоплазматической с некоторым редким участием ядра. Умеренная экспрессия была обнаружена в 9 (6,8 %) и сильная экспрессия в 8 (6,0 %) случаях [45].

При уротелиальной карциноме из 94 исследованных образцов от пациентов ≈ 30 % дали положительное окрашивание как в цитоплазме, так и в ядрах. При этом экспрессия белка *GAGE* не была связана с рецидивами и исходами выживания [46].

Экспрессия *GAGE* упоминается при мезотелиоме. Три первичные культуры (MES-CM98, MES-MM98 и MES-OC99) и 3 долговременные культуры (MPP-89, MES-1 и MES-2) клеток мезотелиомы были проанализированы на предмет их конститутивной экспрессии РТА. Анализ ОТ-ПЦР выявил частую экспрессию РТА, принадлежащего к семейству генов *GAGE* [47]. Наличие антигенов X-хромосомных РТА в опухолях зародышевых клеток было исследовано в 74 семиномах яичек, включая 72 классические семиномы и 2 сперматоцитарные семиномы: *GAGE* экспрессировался в 63 из 74 случаев [48].

Экспрессию гена *GAGE* определяли также в образцах клеточных линий меланомы, где она достигала 95,5 % [49]. Кроме того, экспрессия гена *GAGE* встречается при раке головы и шеи и отрицательно влияет на прогноз [50].

Интересно, что белки *GAGE* могут также использоваться для определения прогрессирования заболевания, поскольку их экспрессия коррелирует с плохим прогнозом при раке желудка, пищевода и нейробластоме [51–53].

Перспективы применения белков группы *GAGE* в качестве мишени для специфической иммунотерапии

Анализ экспрессии *GAGE* у больных онкологическими заболеваниями показал, что белки *GAGE* имеют более широкий профиль экспрессии в нормальных тканях, чем многие РТА. Экспрессия большинства

РТА ограничена зародышевыми клетками взрослого мужчины и зародышевыми клетками плода обоих полов, но экспрессия GAGE также сохраняется в подгруппе ооцитов взрослого яичника [27]. Кроме того, белки GAGE играют роль в клетках Лейдига и Сертоли, находящихся на стадии эмбрионального развития. Экспрессия может наблюдаться в течение нескольких недель во 2-м триместре беременности [54]. Из-за иммунных привилегий зародышевых клеток (низкая или нулевая экспрессия HLA класса I и гематоэнцефалический барьер) и незрелого состояния адаптивной иммунной системы плода экспрессия GAGE в половых и других клетках плода вероятнее всего не будет препятствовать применению методов GAGE-направленной иммунотерапии [2]. Соответственно, клеточные и гуморальные иммунные ответы на белки GAGE были обнаружены при меланоме [33].

Интересно, что иммуногистохимический анализ показал значительные различия в уровне экспрессии GAGE в опухолях, и большинство положительных опухолей также включают GAGE-отрицательные клетки. Это может иметь значимые последствия для разработки противораковых вакцин, распознающих GAGE, поскольку GAGE-отрицательные клетки в GAGE-положительных опухолях могут избежать иммунотерапевтического воздействия. Однако проблема гетерогенности может быть преодолена путем включения ингибиторов ДНК-метилтрансфераз и гистондеацетилаз в терапевтическое лечение, поскольку было показано, что они индуцируют экспрессию GAGE в раковых клетках [52, 55].

Важно понимать, что белковые продукты генов GAGE имеют более 95 % гомологии, кроме GAGE-1, который имеет уникальный С-конец, кодируемый дополнительным экзоном, с учетом умеренной гомологии 80 % в сравнении с другими генами семейства. Таким образом, специальные антитела, разработанные против отдельных белков семейства GAGE, с высокой вероятностью будут обладать кроссреактивностью среди белков группы GAGE [20].

Заключение

Семейство РТА GAGE представляет собой очень интересный объект для дальнейших исследований, и их продолжение может сыграть важную роль в развитии методов терапии опухолей. Экспрессируясь в раковых клетках, белки GAGE провоцируют против них гуморальный и клеточный иммунный ответ. Это подразумевает, что они вполне соответствуют требованиям, предъявляемым к мишеням для иммунотерапии опухолей.

Отсутствие экспрессии GAGE в большинстве здоровых тканей позволяет рассматривать данные белки как возможный диагностический и прогностический маркер раковых заболеваний, который в дальнейшем можно использовать для оценки злокачественности и мониторинга опухолей для подбора тактики лечения. К настоящему моменту в России известен опыт успешного создания бактериального продуцента белка GAGE1, предназначенного для дальнейших разработок противоопухолевых препаратов [56], а также оценки экспрессии транскриптов генов группы GAGE в клеточных линиях и в опухолях, полученных от больных меланомой [49, 57, 58].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Stevenson B.J., Iseli C., Panji S. et al. Rapid evolution of cancer/testis genes on the X chromosome. *BMC Genomics* 2007;8:129. DOI: 10.1186/1471-2164-8-129
- Fijak M., Meinhardt A. The testis in immune privilege. *Immunol Rev* 2006;213:66–81. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2006.00438.x
- Simpson A.J., Caballero O.L., Jungbluth A. et al. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2005; (8):615–25. DOI: 10.1038/nrc1669
- Head J.R., Billingham R.E. Immune privilege in the testis. II. Evaluation of potential local factors. *Transplantation* 1985;40(3):269–75. DOI: 10.1097/00007890-198509000-00010
- Hutter H., Dohr G. HLA expression on immature and mature human germ cells. *J Reprod Immunol* 1998;38(2):101–22. DOI: 10.1016/s0165-0378(98)00032-1
- Kirkin A.F., Dzhandzhugazyan K.N., Zeuthen J. Cancer/testis antigens: structural and immunobiological properties. *Cancer Invest* 2002;20(2):222–36. DOI: 10.1081/cnv-120001150
- Van Der Bruggen P., Zhang Y., Chaux P. et al. Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. *Immunol Rev* 2002;188(1):51–64. DOI: 10.1034/j.1600-065x.2002.18806.x
- Kawabata R., Wada H., Isobe M. et al. Antibody response against NY-ESO-1 in CHP-NY-ESO-1 vaccinated patients. *Int J Cancer* 2007;120(10):2178–84. DOI: 10.1002/ijc.22583
- Uenaka A., Wada H., Isobe M. et al. T cell immunomonitoring and tumor responses in patients immunized with a complex of cholesterol-bearing hydrophobized pullulan (CHP) and NY-ESO-1 protein. *Cancer Immun* 2007;7:9.
- Odunsi K., Qian F., Matsuzaki J. et al. Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/II specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(31):12837–42. DOI: 10.1073/pnas.0703342104
- Turner B., Haendle I., Röder C. et al. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 1999;190(31):1669–78. DOI: 10.1084/jem.190.11.1669
- Marchand M., van Baren N., Weynants P. et al. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene *MAGE-3* and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 1999;80(2):219–30. DOI: 10.1002/(sici)1097-0215(19990118)80:2<219::aid-ijc10>3.0.co;2-s
- Jäger E., Karbach J., Grnjatic S. et al. Recombinant vaccinia/fowlpox NY-ESO-1 vaccines induce both humoral and cellular NY-ESO-1-specific immune responses in cancer patients. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A 2006;103(39):14453–8. DOI: 10.1073/pnas.0606512103
14. Davis I.D., Chen W., Jackson H. et al. Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(29):10697–702. DOI: 10.1073/pnas.0403572101
 15. Burgdorf S.K., Fischer A., Claesson M.H. et al. Vaccination with melanoma lysate-pulsed dendritic cells, of patients with advanced colorectal carcinoma: report from a phase I study. *J Exp Clin Cancer Res* 2006;25(2):201–6.
 16. Reynolds S.R., Celis E., Sette A. et al. HLA-independent heterogeneity of CD8⁺ T cell responses to MAGE-3, Melan-A/MART-1, gp100, tyrosinase, MC1R, and TRP-2 in vaccine-treated melanoma patients. *J Immunol* 1998;161(12):6970–6.
 17. Reynolds S.R., Celis E., Sette A. et al. Identification of HLA-A*03, A*11 and B*07-restricted melanoma-associated peptides that are immunogenic in vivo by vaccine-induced immune response (VIIR) analysis. *J Immunol Methods* 2000;244(1–2):59–67. DOI: 10.1016/S0022-1759(00)00254-4
 18. Van den Eynde B., Peeters O., De Backer O. et al. A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med* 1995;182(3):689–98. DOI: 10.1084/jem.182.3.689
 19. Traversari C., van der Bruggen P., Van den Eynde B. et al. Transfection and expression of a gene coding for a human melanoma antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes. *Immunogenetics* 1992;35(3):145–52. DOI: 10.1007/BF00185107
 20. Gjerstorff M.F., Ditzel H.J. An overview of the GAGE cancer/testis antigen family with the inclusion of newly identified members. *Tissue Antigens* 2008;71(3):187–92. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2007.00997.x
 21. Cilensek Z.M., Yehiely F., Kular R.K., Deiss L.P. A member of the GAGE family of tumor antigens is anti-apoptotic gene that confers resistance to Fas/CD95/APO-1, interferon-gamma, taxol and gamma-irradiation. *Cancer Biol Ther* 2002;1(4):380–7.
 22. Wadle A., Kubuschok B., Imig J. et al. Serological immune response to cancer testis antigens in patients with pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2006;119(1):117–25. DOI: 10.1002/ijc.21744
 23. Jäättelä M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* 1999;248(1):30–43. DOI: 10.1006/excr.1999.4455
 24. Lampros M., Vlachos N., Voulgaris S., Alexiou G.A. The Role of Hsp27 in chemotherapy resistance. *Biomedicine* 2022;10(4):897. DOI: 10.3390/biomedicine10040897
 25. Cao X., Hou J., An Q. et al. Towards the overcoming of anticancer drug resistance mediated by p53 mutations. *Drug Resist Updat* 2020;49:100671. DOI: 10.1016/j.drug.2019.100671
 26. Tuxhorn J.A., Ayala G.E., Smith M.J. et al. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res* 2002;8(9):2912–23.
 27. Gjerstorff M.F., Johansen L.E., Nielsen O. et al. Restriction of GAGE protein expression to subpopulations of cancer cells is independent of genotype and may limit the use of GAGE proteins as targets for cancer immunotherapy. *Br J Cancer* 2006;94(12):1864–73. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603163
 28. De Backer O., Arden K.C., Boretto M. et al. Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res* 1999;59(13):3157–65.
 29. Ruschenburg I., Kubitz A., Schlott T. et al. MAGE-1, GAGE-1/-2 gene expression in FNAB of classic variant of papillary thyroid carcinoma and papillary hyperplasia in nodular goiter. *Int J Mol Medicine* 1999;4(4):445–8. DOI: 10.3892/ijmm.4.4.445
 30. Mischo A., Kubuschok B., Ertan K. et al. Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer. *Int J Cancer* 2006;118(3):696–703. DOI: 10.1002/ijc.21352
 31. Kobayashi Y., Higashi T., Nouse K. et al. Expression of MAGE, GAGE and BAGE genes in human liver diseases: utility as molecular markers for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000;32(4):612–7. DOI: 10.1016/S0168-8278(00)80223-8
 32. Gillespie A.M., Rodgers S., Wilson A.P. et al. MAGE, BAGE and GAGE: tumour antigen expression in benign and malignant ovarian tissue. *Br J Cancer* 1998;78(6):816–21. DOI: 10.1038/bjc.1998.585
 33. Bazhin A.V., Wiedemann N., Schnölzer M. et al. Expression of GAGE family proteins in malignant melanoma. *Cancer Lett* 2007;251(2):258–67. DOI: 10.1016/j.canlet.2006.11.022
 34. Gjerstorff M.F., Pöhl M., Olsen K.E., Ditzel H.J. Analysis of GAGE, NY-ESO-1 and SP17 cancer/testis antigen expression in early stage non-small cell lung carcinoma. *BMC Cancer* 2013;13:466. DOI: 10.1186/1471-2407-13-466
 35. Chen Y.T., Panarelli N.C., Piotti K.C., Yantiss R.K. Cancer-testis antigen expression in digestive tract carcinomas: frequent expression in esophageal squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *Cancer Immunol Res* 2014;2(5):480–6. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0124
 36. Melo D.H., Mamede R.C.M., Neder L. et al. Expression of cancer/testis antigens MAGE-A, MAGE-C1, GAGE and CTAG1B in benign and malignant thyroid diseases. *Oncol Lett* 2017;14(6):6485–96. DOI: 10.3892/ol.2017.7072
 37. Andrade V.C.C., Vettore A.L., Felix R.S. et al. Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun* 2008;8:2.
 38. Van Duin M., Broyl A., de Knegt Y. et al. Cancer testis antigens in newly diagnosed and relapse multiple myeloma: prognostic markers and potential targets for immunotherapy. *Haematologica* 2011;96(11):1662–9. DOI: 10.3324/haematol.2010.037978
 39. Moreaux J., Klein B., Bataille R. A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica* 2011;96(4):574–82. DOI: 10.3324/haematol.2010.033456
 40. Ghafouri-Fard S., Seifi-Alan M., Shamsi R. et al. Immunotherapy in multiple myeloma using cancer-testis antigens. *Iran J Cancer Prev* 2015;8(5):e3755. DOI: 10.17795/ijcp-3755
 41. Kubuschok B., Xie X., Jesnowsk R. et al. Expression of cancer testis antigens in pancreatic carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Int J Cancer* 2004;109(4):568–75. DOI: 10.1002/ijc.20006
 42. Ghadban T., Perez D.R., Vashist Y.K. et al. Expression of cancer testis antigens CT10 (MAGE-C2) and GAGE in gastrointestinal stromal tumors. *Eur J Surg Oncol* 2014;40(10):1307–12. DOI: 10.1016/j.ejso.2014.03.011
 43. Oba-Shinjo S.M., Caballero O.L., Jungbluth A.A. et al. Cancer-testis (CT) antigen expression in medulloblastoma. *Cancer Immun* 2008;8:7.
 44. Riener M., Wild P.J., Soll C. et al. Frequent expression of the novel cancer testis antigen MAGE-C2/CT-10 in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2009;124(2):352–7. DOI: 10.1002/ijc.23966
 45. Balafoutas D., Hausen A., Mayer S. et al. Cancer testis antigens and NY-BR-1 expression in primary breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *BMC Cancer* 2013;13:271. DOI: 10.1186/1471-2407-13-271
 46. Sharma P., Shen Y., Wen S. et al. Cancer-testis antigens: expression and correlation with survival in human urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12(18):5442–7. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0527
 47. Sigalotti L., Coral S., Altomonte M. et al. Cancer testis antigens expression in mesothelioma: role of DNA methylation and bioimmunotherapeutic implications. *Br J Cancer* 2002;86(6):979–82. DOI: 10.1038/sj.bjc.6600174
 48. Chen Y., Chiu R., Lee P. et al. Chromosome X-encoded cancer/testis antigens show distinctive expression patterns in developing gonads and in testicular seminoma. *Hum Reprod* 201;26(12):3232–43. DOI: 10.1093/humrep/der330

49. Danilova A., Misyurin V., Novik A. et al. Cancer/testis antigens expression during cultivation of melanoma and soft tissue sarcoma cells. *Clin Sarcoma Res* 2020;10:3. DOI: 10.1186/s13569-020-0125-2
50. Cuffel C., Rivals J., Zaugg Y. et al. Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2011;128(11):2625–34. DOI: 10.1002/ijc.25607
51. Zambon A., Mandruzzato S., Parent A. et al. MAGE, BAGE, and GAGE gene expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the gastric cardia. *Cancer* 2001;91(10):1882–8.
52. Kong U., Koo J.Y., Choi K.H. et al. The expression of GAGE gene can predict aggressive biologic behavior of intestinal type of stomach cancer. *Hepatogastroenterology* 2004;51(59):1519–23.
53. Cheung I.Y., Chi S.N., Cheung N.K. Prognostic significance of GAGE detection in bone marrows on survival of patients with metastatic neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2000;35(6):632–634. DOI: 10.1002/1096-911x(20001201)35:6<632::aid-mpo31>3.0.co;2-1
54. Gjerstorff M.F., Kock K., Nielsen O., Ditzel H.J. MAGE-A1, GAGE and NY-ESO-1 cancer/testis antigen expression during human gonadal development. *Hum Reprod* 2007;22(4):953–60. DOI: 10.1093/humrep/del494
55. D'Alessio A.C., Weaver I.C.G., Szyf M. Acetylation-induced transcription is required for active DNA demethylation in methylation-silenced genes. *Mol Cell Biol* 2007;27(21):7462–74. DOI: 10.1128/MCB.01120-07
56. Финашутина Ю.П., Мисюрин В.А., Пушкова Е.Н., Мисюрин А.В. Способ получения рекомбинантного белка GAGE1 человека. Патент на изобретение RU 2652890C1 от 05.03.2018. Finashutina Yu.P., Misyurin V.A., Pushkova E.N., Misyurin A.V. Method of obtaining recombinant human GAGE1 protein. Patent for the invention RU 2652890C1, dated 05.03.2018.
57. Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Бурова О.С. и др. Экспрессия раково-тестикулярных антигенов в клетках меланомы человека. *Сибирский онкологический журнал* 2010;1:29–39. Mikhailova I.N., Kovalevsky D.A., Burova O.S. et al. Expression of cancer-testicular antigens in human melanoma cells. *Sibirskiy onkologicheskij zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2010;1:29–39. (In Russ.).
58. Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Вишневская Я.В. и др. Экспрессия генов раково-тестикулярных антигенов в первичной меланоме кожи человека. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН* 2010;21(2):52–65. Mikhailova I.N., Kovalevsky D.A., Vishnevskaya Ya.V. et al. Expression of cancer-testicular antigen genes in primary human skin melanoma. *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina RAMN = Journal of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center* 2010;21(2):52–65.

Вклад авторов

А.А. Рудакова: сбор и анализ данных литературы, написание и редактирование текста статьи;

А.Д. Ширин, Н.В. Голубцова, М.В. Пинюгина: сбор и анализ данных литературы, редактирование статьи;

В.А. Мисюрин: разработка концепции и дизайна обзора, сбор и анализ данных литературы, редактирование статьи.

Author's contribution

A.A. Rudakova: literature data collection and analysis, article writing, editing of the article;

A.D. Shirin, N.V. Golubtsova, M.V. Pinyugina: literature data collection and analysis, editing of the article;

V.A. Misyurin: concept and design, literature data collection and analysis, editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.А. Рудакова / A.A. Rudakova: <https://orcid.org/0000-0001-7266-7689>

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

Н.В. Голубцова / N.V. Golubtsova: <https://orcid.org/0000-0002-8630-1968>

М.В. Пинюгина / M.V. Pinyugina: <https://orcid.org/0000-0003-0318-3896>

В.А. Мисюрин / V.A. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0002-0762-5631>

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: 26.12.2022. Принята к публикации: 20.02.2023.

Article received: 26.12.2022. Accepted for publication: 20.02.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-1-19-27>

Биомаркеры опухолевого микроокружения при раке молочной железы

П.М. Соколов¹, А.В. Караулов², А.В. Суханова³, И.Р. Набиев^{2,3}

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»; Россия, 115409 Москва, Каширское шоссе, 31;

²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119992 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

³Университет Реймса Шампань-Арденн; Франция, 51100 Реймс, ул. Когнак Жэ, 51

Контакты: Игорь Руфаилович Набиев igor.nabiev@gmail.com

Рак молочной железы является наиболее частой нозологией в структуре женской онкологической заболеваемости. Опухолевая структура при раке молочной железы характеризуется не только морфологической гетерогенностью опухолевых клеток, но и высокой степенью гетерогенности опухолевого микроокружения, включающего клетки иммунной системы, элементы клеточного матрикса и другие компоненты, которые могут оказывать проонкогенное и противоонкогенное действие. Таким образом, применение персонализированных подходов для выбора наиболее эффективных протоколов терапии рака молочной железы невозможно без комплексного исследования целевых онкомаркеров и биомаркеров клеточного микроокружения.

Цель работы – систематизировать данные о биомаркерах опухолевого микроокружения и провести оценку прогностической ценности исследования биомаркеров опухолевого микроокружения при раке молочной железы. Биомаркеры опухолевого микроокружения являются важным прогностическим фактором. Молекулярно-генетический анализ профиля таких биомаркеров, а также иммуногистохимические исследования взаимного расположения клеток опухоли и опухолевого микроокружения могут использоваться для высокоточной онкодиагностики и для подбора эффективной персонализированной терапии при раке молочной железы. Необходимость такого широкого комплексного исследования определяется пластичностью клеток микроокружения опухоли, которые могут как поддерживать опухолевый рост, блокировать иммунный ответ и обеспечивать резистентность к лекарственным препаратам, так и проявлять противоопухолевую активность.

В настоящем обзоре проанализированы ключевые элементы микроокружения опухоли, встречающиеся при раке молочной железы, примеры взаимодействия опухолевых клеток с микроокружением, данные прогностической и диагностической ценности биомаркеров микроокружения опухоли. Показано, что микроокружение опухоли влияет на образование лекарственной устойчивости и эффективность различных методов терапии рака молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, микроокружение опухоли, биомаркеры, детекция

Для цитирования: Соколов П.М., Караулов А.В., Суханова А.В., Набиев И.Р. Биомаркеры опухолевого микроокружения при раке молочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(1):19–27. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-19-27

Tumor microenvironment biomarkers in breast cancer

Pavel M. Sokolov¹, Alexander V. Karaulov², Alyona V. Sukhanova³, Igor R. Nabiev^{2,3}

¹National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute); 31 Kashirskoe Shosse, 115409 Moscow, Russia;

²Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University); Bld. 2, 8 Trubetskaya St., 119146 Moscow, Russia;

³Université de Reims Champagne-Ardenne; 51 rue Cognacq Jay, 51100 Reims, France

Contact: Igor Rufailovich Nabiev igor.nabiev@gmail.com

Breast cancer is the most common malignant tumor in women. The tumor structure in breast cancer is characterized not only by morphological heterogeneity of tumor cells, but also by a high degree of heterogeneity of tumor

microenvironment, which contains immune cells, cell matrix elements, and other components that may have procarcinogenic or anticarcinogenic effects. Therefore, personalized approaches to selecting the most effective breast cancer treatment protocols cannot be used without comprehensive analysis of the target cancer markers and cellular microenvironment biomarkers.

This review is aimed at systematizing the data on tumor microenvironment biomarkers and evaluating the prognostic value of the analysis of tumor microenvironment biomarkers in breast cancer.

Biomarkers of the tumor microenvironment are important prognostic factors. Molecular genetic analysis of the profile of these biomarkers, as well as immunohistochemical studies of the mutual arrangement of tumor cells and tumor microenvironment can be used for high-accuracy cancer diagnosis and for the selection of effective personalized therapy in breast cancer. This comprehensive research is necessary because of the plasticity of tumor microenvironment cells, which can either support tumor growth, block immune response, and provide resistance to drugs, or exhibit antitumor activity.

The key elements of the tumor microenvironment in breast cancer have been analyzed, and examples of interaction between tumor cells and the microenvironment, as well as data on the prognostic and diagnostic values of tumor microenvironment biomarkers, have been summarized. The tumor microenvironment has been shown to affect the formation of drug resistance and the efficiencies of various breast cancer therapies.

Keywords: breast cancer, tumor microenvironment, biomarkers, detection

For citation: Sokolov P.M., Karaulov A.V., Sukhanova A.V., Nabiev I.R. Tumor microenvironment biomarkers in breast cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2023;22(1):19–27. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-19-27

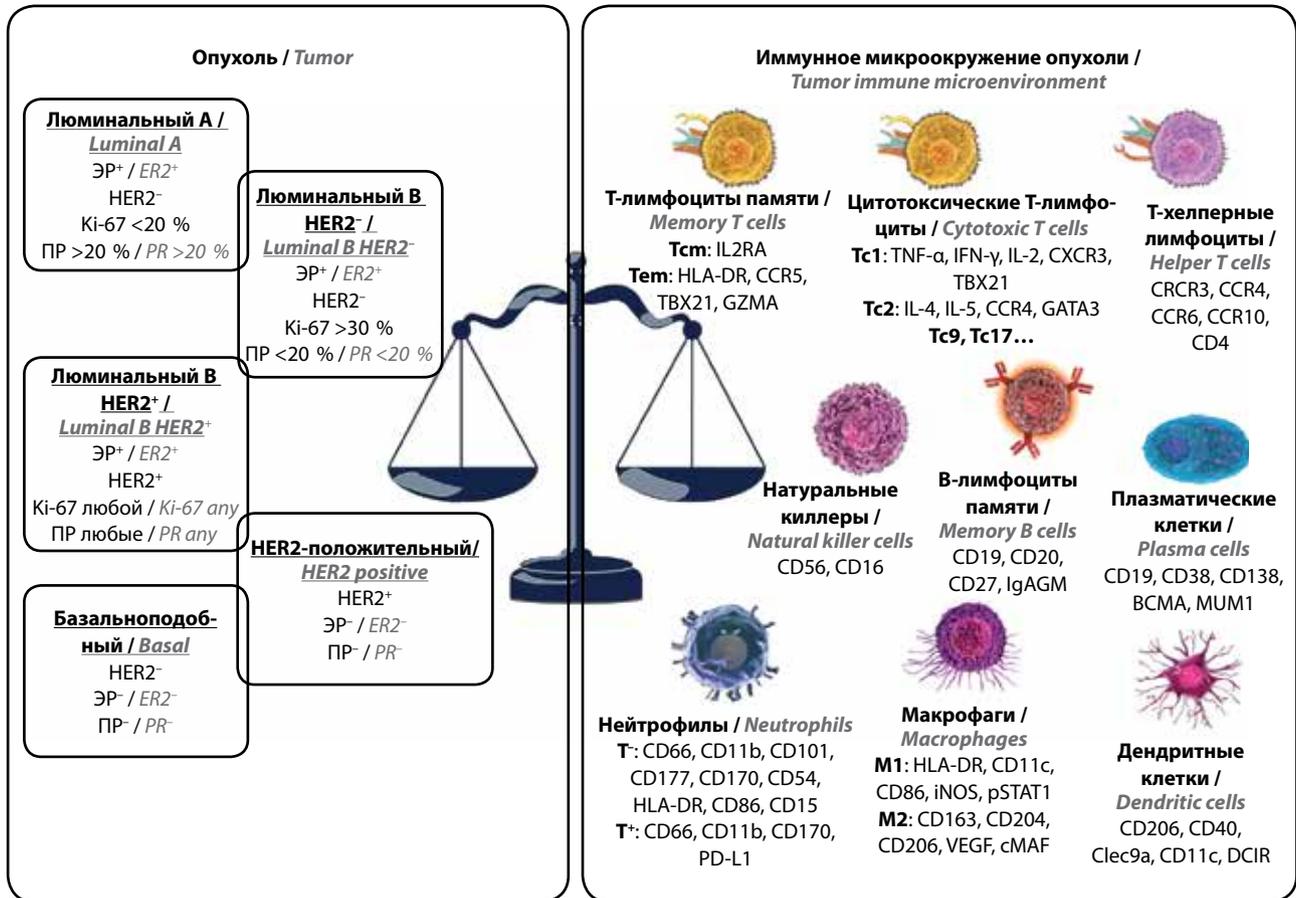
Введение

Рак молочной железы (PMЖ) — самое часто диагностируемое онкологическое заболевание в женской популяции как в России, так и во всем мире [1]. Важным условием снижения инвалидизации и смертности от PMЖ является его ранняя высокоточная диагностика, а также выбор эффективной стратегии персонализированной терапии. Согласно клиническим рекомендациям Минздрава России, диагностика PMЖ включает гистологическое и иммуногистохимическое исследование биопсийного и/или операционного материала с указанием гистологического варианта, степени дифференцировки, опухолевых специфических биомаркеров — HER2, Ki-67, эстрогенового (ЭР) и прогестеронового рецепторов (ПР) [2]. Известно, что опухоли молочной железы гетерогенны по своей структуре, что обуславливает возможность приобретения устойчивости к различным видам терапии, а также их метастатический потенциал [3–5]. Рост опухоли определяется активным взаимодействием опухолевых клеток с иммунной системой пациента. Так, опухолевое микроокружение содержит регуляторные, цитотоксические и хелперные Т-лимфоциты [6], В-лимфоциты [7], макрофаги [8], нейтрофилы [9] и дендритные клетки [10] (см. рисунок), которые могут взаимодействовать с клетками опухоли с помощью сигнальных молекул (цитокины, интерлейкины (IL), факторы роста) и ферментов (оксидазы, протеиназы и др.). Гетерогенность микроокружения опухоли также выражается в локальных изменениях pH, уровня кислорода, градиентов концентрации питательных веществ. Таким образом, иммунная система пациента играет важную роль как

в сдерживании канцерогенеза, так и в его прогрессии. Анализ данных литературы показывает, что все больше внимания уделяется детальной характеристике опухолевого микроокружения с целью найти новые мишени для терапии и разработать высокоспецифические методы лечения, снизить устойчивость опухоли к традиционным методам лечения, что должно обеспечить увеличение периода ремиссии и улучшить показатели долгосрочной выживаемости [11]. Кроме того, дополнительное исследование биомаркеров компонентов микроокружения опухоли в сыворотке крови пациентов поможет детализировать клиническую картину развития PMЖ [12], а также уточнять вероятные эффективные пути лечения [13].

Биомаркеры иммунного микроокружения опухоли и прогноз рака молочной железы

Макрофаги и дендритные клетки (ДК) образуются в процессе дифференцировки моноцитов и являются компонентами врожденной иммунной системы. При этом популяция макрофагов, инфильтрирующая опухоль, очень гетерогенна, так как фенотип и функции макрофагов могут меняться в зависимости от микроокружения. Макрофаги фенотипа M1, положительные по таким маркерам, как HLA-DR, CD11c, CD86, iNOS и pSTAT1, поддерживают развитие воспаления и являются провоспалительными, а макрофаги фенотипа M2, положительные по CD163, CD204, CD206, VEGF и cMAF, наоборот, оказывают противовоспалительный эффект [14]. А. Bobrie и соавт. при исследовании образцов опухолей неметастатического трижды негативного PMЖ от 285 пациентов



Биомаркеры рака молочной железы и компонентов иммунного микроокружения опухоли. ЭР – эстрогеновые рецепторы; ПР – прогестероновые рецепторы

Biomarkers of breast cancer and components of tumor immune microenvironment. ER – estrogen receptor; PR – progesterone receptor

выявили 4 патогномичных маркера макрофагов – CD68, IRF8, CD163 и CD206 [15]. Полученные результаты показали, что РМЖ у пациентов, имеющих CD206⁺-фенотип макрофагов, отличается более благоприятным прогнозом. Другими авторами было продемонстрировано, что дифференциация в M2-макрофаги может коррелировать с повышенным ангиогенезом и агрессивностью опухоли [16].

Дендритные клетки распознают и представляют опухолевые антигены в составе главного комплекса гистосовместимости и далее активируют Т-лимфоциты, являясь связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом. При этом в зависимости от типа, степени созревания ДК могут как усиливать эффекторный ответ Т-лимфоцитов, так и снижать его, обуславливая прогрессию опухоли [17]. J. Szpor и соавт. исследовали популяции ДК с определением маркеров CD1a, CD83, CD123, CD208 и CD209 при различных типах РМЖ [10]. Проведенные исследования показали, что ДК с фенотипом CD1a⁺ обнаруживались преимущественно внутри области опухолевого роста, в то время как положительные

по другим исследованным маркерам ДК обычно локализовались на краю опухолевого роста. Кроме того, ДК CD123⁺ преимущественно встречаются в более агрессивных опухолях молочной железы с плохим прогнозом, а также всего в 15 % случаев базального подтипа РМЖ, который также характеризуется высокой агрессивностью, устойчивостью к терапии и плохим прогнозом. ДК CD83⁺ чаще присутствуют в опухолях люминальных подтипов, а выживаемость пациентов с метастазами в лимфатические узлы коррелирует с уровнем экспрессии CD83⁺. ДК CD208⁺ чаще встречаются в ЭР- и ПР-отрицательных опухолях, а также в опухолях с высоким уровнем Ki-67 и HER2, что обычно характеризует более агрессивные формы РМЖ с повышенной устойчивостью к терапии.

Цитотоксические, хелперные и Т-лимфоциты памяти, В-лимфоциты памяти, плазматические клетки, натуральные киллеры (НК) и другие потомки лимфоидных прогениторных клеток составляют адаптивную иммунную систему. Наличие в микроокружении опухоли цитотоксических Т-лимфоцитов CD8⁺

коррелирует с лучшим клиническим исходом и более длительным периодом ремиссии пациентов. При этом Т-хелперы (CD4⁺-Т-лимфоциты) являются 2-м по распространенности типом Т-лимфоцитов в опухоли [18]. Показано, что опухоли, содержащие большее количество CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов, лучше отвечают на иммунотерапию, чем опухоли с их низким содержанием [19]. R. Saragica и соавт. проанализировали результаты 7 клинических исследований, которые включали данные более 3 тыс. пациентов с неинвазивным РМЖ, и пришли к выводу, что высокое содержание лимфоцитов, инфильтрующих опухоль, связано с большей вероятностью рецидива и более агрессивными формами РМЖ [20]. Т-лимфоциты памяти являются субпопуляцией CD8⁺-Т-лимфоцитов, а также положительны по CD103, CD69 и PD1 [21]. P. Savas и соавт. методом профилирования экспрессии на единичных клетках установили, что Т-лимфоциты памяти отличаются высокими уровнями экспрессии молекул иммунных контрольных точек, включая PD-1, CTLA4, TIM3, TIGIT, LAG3, а также эффекторных белков, включая гранзим В и перфорин. При этом их присутствие в опухолевом микроокружении коррелирует с лучшей выживаемостью пациентов с базальноподобным подтипом РМЖ [22]. Эта особенность делает их одними из ключевых мишеней при модуляции и ингибировании контрольных точек иммунного ответа. Также экспрессия эффекторных цитотоксических белков объединяет их еще с одним типом клеток опухолевого микроокружения – НК. Известно, что НК микроокружения опухоли при РМЖ характеризуются высоким уровнем экспрессии молекулы адгезии CD56, рецептора CD16, а также отсутствием экспрессии CD3 [23]. Показано, что НК могут вызывать активацию клеточных рецепторов смерти, таких как Fas-лиганд и TRAIL (апоптоиндуцирующий лиганд, связанный с фактором некроза опухолей (TNF)), что приводит к классическому апоптозу опухолевых клеток. Кроме того, различные популяции НК могут оказывать иммунорегуляторный эффект, например путем продукции цитокинов, таких как интерферон γ (IFN- γ) и TNF- α [24]. S. Nersesian и соавт. провели анализ результатов 8 клинических исследований с данными 1631 пациента и установили, что НК, инфильтрующие опухоли, чаще ассоциированы с лучшей выживаемостью пациентов, хотя и с высоким разбросом полученных данных, что объясняется высокой гетерогенностью РМЖ [25]. Плазматические клетки, положительные по таким маркерам, как CD38 и CD138, играют важную роль в презентировании антигенов и гуморальном иммунитете, а также могут оказывать цитотоксический эффект как через продукцию цитокинов IL-12 и IFN- γ [26], так и через выработку опухольспецифических IgG, проявляющих противоопухолевую ак-

тивность [27]. A. Sakaguchi и соавт., проанализировав образцы биоптатов 146 пациентов, получавших неоадьювантную химиотерапию, показали, что у пациентов с высоким содержанием плазматических клеток до химиотерапии в результате терапии наблюдался лучший ответ, а также отмечалось повышенное содержание В-лимфоцитов. Кроме того, эта закономерность прослеживалась даже в случае с базальноподобным подтипом РМЖ [28].

Традиционно для выбора терапии и определения прогноза РМЖ применяется исследование образцов опухолевой ткани методами иммуногистохимии с детекцией таких целевых онкомаркеров, как HER2, ЭР, ПР и Ki-67, что позволяет выделить 5 молекулярно-биологических подтипов: тройной негативный, люминальный А, люминальный В HER2⁻, люминальный В HER2⁺ и нелюминальный (HER2⁺). Каждый из этих подтипов отличается своим прогнозом и рекомендованными методами лечения. Так, трижды негативный подтип характеризуется агрессивным клиническим течением и низкими показателями ремиссии и выживаемости. РМЖ данного подтипа не поддается эндокринной и HER2-направленной терапии, но он чаще других подтипов характеризуется более высоким уровнем экспрессии PD-L1, что дает надежду на разработку эффективной иммунотерапии, нацеленной на PD-L1 [29]. Подтип люминальный А имеет хороший прогноз по выживаемости, а срок ремиссии составляет более 10 лет [30]. Опухоли данного подтипа в большинстве случаев хорошо поддаются эндокринной терапии и в некоторых случаях химиотерапии. Подтип люминальный В характеризуется худшим прогнозом по сравнению с люминальным А, он менее восприимчив к эндокринной терапии, но при этом лучше поддается химиотерапии, а срок ремиссии составляет менее 10 лет [31]. HER2⁺-подтип имеет прогноз хуже, чем люминальные А и В, но несколько лучше, чем базальный подтип, а срок ремиссии составляет менее 10 лет. Этот подтип поддается HER2-направленной терапии и химиотерапии с антрациклинами [32]. Тем не менее вышеизложенные данные литературы показывают, что для полного понимания прогноза РМЖ и выбора персонализированной стратегии лечения существенное значение приобретают дополнительные исследования микроокружения опухоли. Анализ пула клеток, инфильтрующих опухоль, их соотношения и степени дифференциации, а также детекция профилей биомаркеров микроокружения опухолевых клеток могут оказать значительное влияние на оценку прогноза заболевания и выбор подходящей линии терапии (см. таблицу). Проведение таких дополнительных исследований позволит более эффективно диагностировать, разрабатывать новые и выбирать эффективные подходы к терапии РМЖ, включая иммунотерапию.

Биомаркеры иммунного микроокружения опухоли

Biomarkers of tumor immune microenvironment

Тип клеток Cell type	Маркер/группа маркеров Marker/group of markers	Прогноз Prognosis	Ссылка Reference
Макрофаги Macrophages	M1 – HLA-DR, CD11c, CD86, iNOS, pSTAT1	У пациентов с тройным негативным подтипом увеличенное число макрофагов M1 коррелирует с лучшим прогнозом M1 is correlated with a better prognosis in triple-negative patients	[14]
	M2 – CD163, CD206	Благоприятный в случае тройного негативного подтипа Good in triple-negative patients	[15]
	M2 – CD206	Неблагоприятный: корреляция с повышенным уровнем ангиогенеза и агрессивностью опухоли в нелюминальных подгруппах Poor: the markers are correlated with enhanced angiogenesis and aggressive tumor behavior in nonluminal subgroups	[16]
Дендритные клетки Dendritic cells	CD83	Корреляция с более длительным безрецидивным прогнозом и лучшим показателем выживаемости The marker is correlated with a longer relapse-free period and a higher survival rate	[10]
	CD123	Преимущественно встречается в более агрессивных опухолях с неблагоприятным прогнозом The marker is predominantly found in more aggressive tumors with a poor prognosis	
	CD208	Характерно для агрессивных форм с повышенной устойчивостью к терапии тамоксифеном The marker is characteristic of aggressive tumors with an increased resistance to tamoxifen	
Цитотоксические Т-лимфоциты Cytotoxic T cells	CD8	Корреляция с лучшим клиническим прогнозом и более длительным периодом ремиссии пациентов The marker is correlated with a better prognosis and a longer relapse	[19]
Хелперные Т-лимфоциты Helper T cells	CD4	Если также присутствуют CD8 ⁺ -Т-лимфоциты, то опухоль лучше отвечает на иммунотерапию If there are also CD8 ⁺ T cells, the tumor responds better to immunotherapy	
Т-лимфоциты памяти Memory T cells	PD-1, CTLA4, TIM3, TIGIT, LAG3	Корреляция с лучшим показателем выживаемости пациентов с тройным негативным подтипом The markers are correlated with a higher survival rate of triple-negative patients	[22]
Натуральные киллеры Natural killer cells	CD56, CD16	Корреляция с лучшим показателем выживаемости пациентов The markers are correlated with a higher survival rate	[25]
Плазматические клетки Plasma cells	CD38, CD138	Корреляция с лучшим ответом на химиотерапию The markers are correlated with a better response to chemotherapy	[28]
Нейтрофилы Neutrophils	CD66, CD11b, CD170, PDL1	Большая вероятность метастазирования A high probability of metastasizing	[33]

Оценка микроокружения опухоли для анализа роста, метастазирования и формирования устойчивости к терапии

Многие исследователи сравнивают опухоль и ее микроокружение с отдельным органом, содержащим

собственную кровеносную, лимфатическую и нервную системы, собственные иммунные клетки и внеклеточный матрикс, что в совокупности с факторами роста, гормонами и другими молекулярными компонентами обеспечивает опухолевый рост и уклонение

от терапии. Микроокружение опухоли секретирует везикулярные структуры (экзосомы), регуляторные РНК, которые меняют комплексные свойства опухолевых тканей. Аномальные условия гипоксии, нетипичные для организма концентрации различных компонентов, метаболические нарушения – все это влияет на эффективность той или иной линии терапии и часто для эффективной терапии недостаточно воздействовать только на раковые клетки, а необходим комплексный подход, затрагивающий изменение сигнальных путей, моделирование иммунного ответа и многие другие естественные защитные факторы организма [34]. На сегодняшний день известны механизмы, с помощью которых опухоль может приобретать множественную лекарственную устойчивость, например путем экспрессии аденозинтрифосфат-связывающих кассет, активации онкогенов, дерегуляции генов-супрессоров опухоли и т. д. Раковые клетки, которые подвергались воздействию лекарств, приобретают фенотип, который обеспечивает им устойчивость к последующей терапии, а стромальная ткань микроокружения опухоли обеспечивает им защиту от терапии, переводя их в состояние, подобное стволовым клеткам [35, 36].

Ангиогенезу в опухоли способствуют как раковые, так и эндотелиальные клетки. Кровеносная и лимфатическая системы вовлечены в раннее метастазирование. Так, эндотелиальный фактор роста сосудов VEGF-A вызывает пролиферацию сосудистых эндотелиальных клеток, а VEGF-C, VEGF-D и рецептор VEGFR3 усиливают пролиферацию лимфатических эндотелиальных клеток, что помогает питать растущую опухоль. Гипоксия, которая может наблюдаться в различных местах опухоли, запускает процесс локального роста концентрации VEGF, а последующая активация рецептора VEGFR2 на эндотелиальных клетках вызывает продукцию факторов 1 и 2, индуцируемых гипоксией, что в конечном итоге приводит к пролиферации, росту и созреванию эндотелиальных клеток [37]. Это, в свою очередь, приводит к появлению устойчивости опухоли к провоспалительной стимуляции, например к $IFN-\gamma$, $IL-1$ и $TNF-\alpha$. Кроме того, стромальные клетки могут усиливать экспрессию ингибиторов рецепторов Т-лимфоцитов, включая PD-L1, PD-L2, а также повышать концентрацию ингибирующих молекул, таких как $IL-6$, $IL-10$ и $TNF-\alpha$ [38], тем самым поддерживая постоянное воспаление в опухолевом микроокружении.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) в ответ на воспаление начинают перемещаться к месту повреждения, чтобы либо дифференцироваться в поврежденные клетки, либо секретировать различные трофические факторы, необходимые для активации местных специфических стволовых клеток, что обуславливает их присутствие в опухолевом микроокру-

жении [39]. МСК продуцируют EGF, $IL-6$, $IL-8$, хемокины, которые индуцируют пролиферацию клеток, а также ингибируют пролиферацию $CD4^+$ - и $CD8^+$ -Т-лимфоцитов. Кроме того, МСК также способствуют образованию новых сосудов, продуцируя ангиогенные факторы или дифференцируясь в эндотелиальные клетки [40]. D. Aldinucci и соавт. показали, что МСК вовлечены в синтез воспалительного хемокина CCL5, который отвечает за потенциал метастазирования при РМЖ [41].

Опухольассоциированные фибробласты могут индуцировать эпителиально-мезенхимальный переход, что меняет клеточный цитоскелет, активность киназ и снижает эффективность иммунного ответа, что, в свою очередь, позволяет опухолевым клеткам мигрировать и индуцирует образование плюрипотентных опухолевых клеток [42]. Также опухольассоциированные фибробласты вызывают репрограммирование макрофагов в фенотип M2, что в конечном итоге вызывает дополнительную блокировку пролиферации Т-лимфоцитов [43].

Большинство опухолевых клеток образуются из опухолевых стволовых клеток (ОСК), которые обладают поверхностными маркерами, сходными с таковыми на поверхности стволовых клеток. В.-B.S. Zhou и соавт. показали, что при подсадке мышам с иммунодефицитом только ОСК приводят к росту родительских раковых клеток [44]. Так как ОСК обладают пластичностью и иммуномодулирующими свойствами, они способны уклоняться от иммунной терапии и, следовательно, являются наиболее злокачественными опухолевыми клетками [45]. В процессе клеточного слияния ОСК с фибробластами, макрофагами и МСК образуются aberrantные клетки, обладающие свойствами стволовых клеток, что тесно коррелирует с инициацией опухолевого роста и метастатическим потенциалом [46]. Опухолевые стволовые клетки способствуют высокой неоднородности опухоли и обладают сложным и изменчивым профилем биомаркеров, что способствует устойчивости опухолей к радио-, химио- и иммунотерапии.

Клетки иммунной системы, инфильтрующие опухоль, оказывают двойной эффект: с одной стороны, макрофаги в состоянии M2, Т-хелперы и Т-регуляторные клетки поддерживают рост опухоли, а с другой – НК, антигенпрезентирующие клетки, Т-лимфоциты и макрофаги в состоянии M1 защищают организм от опухолевого роста. Связанные с опухолью макрофаги происходят из воспалительных моноцитов, классифицируются как провоспалительные макрофаги (M1) и обладают противораковой активностью за счет продукции $IL-1$ и $TNF-\alpha$, а противовоспалительные макрофаги (M2) поддерживают рост опухоли за счет выработки иммуносупрессивных цитокинов, таких как $IL-10$ [47]. Связанные с опухолью

нейтрофилы также представлены 2 подтипами. Нейтрофилы подтипа N1 обладают противоопухолевой активностью, а N2, наоборот, поддерживают ее рост. Трансформирующий фактор роста β (TGF- β), который активно экспрессируется в опухоли, индуцирует переход нейтрофилов в состояние N2, которые, в свою очередь, продуцируют мутагенные факторы – активные формы кислорода и монооксид азота, а также ингибируют пролиферацию Т-лимфоцитов, изменяя активность PD-1/PD-L1-сигнального пути [33, 48]. Т-лимфоциты борются с опухолевым ростом благодаря своей литической активности и IFN- γ -зависимой остановке клеточного цикла. После лизиса клеточные компоненты фагоцитируются и экспрессируются на поверхности антигенпрезентирующих клеток, и лимфоциты приобретают противоопухолевую активность. При этом из-за присутствия IL-6 и факторов стимуляции колоний гранулоцитов антигенпрезентирующие клетки опухолевого микроокружения лишены костимулирующего рецептора B7 и не могут стимулировать цитотоксичность Т-лимфоцитов [49]. НК разрушают раковые клетки, однако их активность ингибируется компонентами микроокружения опухоли, такими как TGF- β , противовоспалительными цитокинами и хемокинами [50]. В-лимфоциты не инфильтруют опухоль, а находятся только в окружающих тканях, и, как правило, их активность направлена против опухоли, однако В-лимфоциты, которые продуцируют IL-10, наоборот, усиливают метастазирование при РМЖ [51]. ДК по своей сути тоже являются антигенпрезентирующими клетками, однако их противоопухолевая активность также сильно снижается из-за того, что опухоль продуцирует большое количество PD-L1 [52].

Внеклеточный матрикс, который состоит из коллагена, протеогликанов, гиалуроновой кислоты и ламелинов, также является значительной частью микроокружения опухоли. Кроме функции поддержания клеток он определяет особенности адгезии и миграции клеток, а также участвует в формировании градиентов концентрации различных растворимых сигнальных молекул, поддерживающих со-

стояние локального воспаления. Таким образом, фенотипирование белковых биомаркеров внеклеточного матрикса может быть использовано для оценки эффективности противоопухолевой иммунотерапии [53]. Многопараметрический анализ содержания экзосом, которые образуются как опухолевыми, так и стромальными клетками и могут в значительной степени влиять на процесс развития опухоли, устойчивости к иммунному ответу и терапии, также может иметь дополнительное клиническое значение в оценке развития опухолевого роста [54].

Заключение

В последние годы особенно важным становится персонализированный подход к выбору эффективной стратегии терапии онкологических заболеваний, в частности РМЖ. При этом успешное использование современных химиотерапевтических и иммунотерапевтических средств определяется возможностью детальной характеристики опухолевой ткани, включающей определение молекулярных подтипов опухоли в совокупности с комплексным фенотипированием опухолевого микроокружения. Прежде всего это связано с высокой гетерогенностью микроокружения опухолей, что может обуславливать образование множественной лекарственной устойчивости и рецидивы заболевания. Многопараметрические иммуногистохимические методы исследования в данном случае более предпочтительны, так как позволяют определить взаимное расположение популяций различных клеток микроокружения и опухолевых клеток, что является важным фактором исследования внутриопухолевых взаимодействий, особенно на малом количестве опухолевой ткани, полученной в ходе биопсии. Таким образом, только комплексная детекция как опухолевых целевых биомаркеров, так и биомаркеров опухолевого микроокружения может позволить провести точную характеристику опухоли, что необходимо для определения правильного прогноза и подбора подходящей терапии, а также поиска новых подходов к эффективной терапии РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71(3):209–49. DOI: 10.3322/caac.21660
2. Клинические рекомендации. Рак молочной железы. Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2021. Доступно по: <https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2021/02/rak-molochnoj-zhelezy-2021.pdf>.
3. Clinical recommendations. Breast cancer. Ministry of Health of Russia, 2021. Available at: <https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2021/02/rak-molochnoj-zhelezy-2021.pdf>.
4. Hanks A.B., Sudhan D.R., Arteaga C.L. Overcoming endocrine resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 2020;37(4):496–513. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.03.009
5. Wang R., Zhu Y., Liu X. et al. The clinicopathological features and survival outcomes of patients with different metastatic sites

- in stage IV breast cancer. *BMC Cancer* 2019;19(1):1091. DOI: 10.1186/s12885-019-6311-z
5. Caswell-Jin J.L., Lorenz C., Curtis C. Molecular heterogeneity and evolution in breast cancer. *Ann Rev Cancer Biol* 2021;5(1):79–94. DOI: 10.1146/annurev-cancerbio-060220-014137
 6. Lundgren C., Bendahl P.-O., Ekholm M. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes as a prognostic and tamoxifen predictive marker in premenopausal breast cancer: data from a randomised trial with long-term follow-up. *Breast Cancer Res* 2020;22(1):140. DOI: 10.1186/s13058-020-01364-w
 7. Hu Q., Hong Y., Qi P. et al. Atlas of breast cancer infiltrated B-lymphocytes revealed by paired single-cell RNA-sequencing and antigen receptor profiling. *Nat Commun* 2021;12(1):2186. DOI: 10.1038/s41467-021-22300-2
 8. Zhao X., Qu J., Sun Y. et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. *Oncotarget* 2017;8(18):30576–86. DOI: 10.18632/oncotarget.15736
 9. Soto-Perez-de-Celis E., Chavarri-Guerra Y., Leon-Rodriguez E., Gamboa-Dominguez A. Tumor-associated neutrophils in breast cancer subtypes. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017;18(10):2689–93. DOI: 10.22034/apjcp.2017.18.10.2689
 10. Szpor J., Streb J., Glajcar A. et al. Dendritic cells are associated with prognosis and survival in breast cancer. *Diagnostics (Basel)* 2021;11(4):702. DOI: 10.3390/diagnostics11040702
 11. Galván Morales M.A., Barrera Rodriguez R., Santiago Cruz J.R., Teran L.M. Overview of new treatments with immunotherapy for breast cancer and a proposal of a combination therapy. *Molecules* 2020;25(23):5686. DOI: 10.3390/molecules25235686
 12. Palazón-Carrión N., Jiménez-Cortegana C., Sánchez-León M.L. et al. Circulating immune biomarkers in peripheral blood correlate with clinical outcomes in advanced breast cancer. *Sci Rep* 2021;11(1):14426. DOI: 10.1038/s41598-021-93838-w
 13. Petitprez F., Meylan M., de Reyniès A. et al. The tumor microenvironment in the response to immune checkpoint blockade therapies. *Front Immunol* 2020;11:784. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00784
 14. Hachim M.Y., Hachim I.Y., Talaat I.M. et al. M1 polarization markers are upregulated in basal-like breast cancer molecular subtype and associated with favorable patient outcome. *Front Immunol* 2020;11:560074. DOI: 10.3389/fimmu.2020.560074
 15. Bobrie A., Massol O., Ramos J. et al. Association of CD206 protein expression with immune infiltration and prognosis in patients with triple-negative breast cancer. *Cancers (Basel)* 2022;14(19):4829. DOI: 10.3390/cancers14194829
 16. Klingen T.A., Chen Y., Aas H. et al. Tumor-associated macrophages are strongly related to vascular invasion, non-luminal subtypes, and interval breast cancer. *Hum Pathol* 2017;69:72–80. DOI: 10.1016/j.humpath.2017.09.001
 17. Karthaus N., Torensma R., Tel J. Deciphering the message broadcast by tumor-infiltrating dendritic cells. *Am J Pathol* 2012;181(3):733–42. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.05.012
 18. Buisseret L., Garaud S., de Wind A. et al. Tumor-infiltrating lymphocyte composition, organization and PD-1/PD-L1 expression are linked in breast cancer. *Oncoimmunology* 2017;6(1):e1257452. DOI: 10.1080/2162402x.2016.1257452
 19. Duan Q., Zhang H., Zheng J., Zhang L. Turning cold into hot: firing up the tumor microenvironment. *Trends Cancer* 2020;6(7):605–18. DOI: 10.1016/j.trecan.2020.02.022
 20. Caparica R., Bruzzone M., Agostinetto E. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes in non-invasive breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Breast (Edinburgh)* 2021;59:183–92. DOI: 10.1016/j.breast.2021.07.007
 21. Wang Z.Q., Milne K., Derocher H. et al. CD103 and intratumoral immune response in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2016;22(24):6290–7. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-16-0732
 22. Savas P., Virassamy B., Ye C. et al. Single-cell profiling of breast cancer T cells reveals a tissue-resident memory subset associated with improved prognosis. *Nat Med* 2018;24(7):986–93. DOI: 10.1038/s41591-018-0078-7
 23. Frazao A., Messaoudene M., Nunez N. et al. CD16⁺NKG2A^{high} natural killer cells infiltrate breast cancer-draining lymph nodes. *Cancer Immunol Res* 2019;7(2):208–18. DOI: 10.1158/2326-6066.cir-18-0085
 24. Wang R., Jaw J.J., Stutzman N.C. et al. Natural killer cell-produced IFN- γ and TNF- α induce target cell cytotoxicity through up-regulation of ICAM-1. *J Leukoc Biol* 2012;91(2):299–309. DOI: 10.1189/jlb.0611308
 25. Nersesian S., Schwartz S.L., Grantham S.R. et al. NK cell infiltration is associated with improved overall survival in solid cancers: a systematic review and meta-analysis. *Transl Oncol* 2021;14(1):100930. DOI: 10.1016/j.tranon.2020.100930
 26. Poropatich K., Dominguez D., Chan W.C. et al. OX40⁺ plasmacytoid dendritic cells in the tumor microenvironment promote antitumor immunity. *J Clin Invest* 2020;130(7):3528–42. DOI: 10.1172/jci.131992
 27. Sharonov G.V., Serebrovskaya E.O., Yuzhakova D.V. et al. B cells, plasma cells and antibody repertoires in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2020;20(5):294–307. DOI: 10.1038/s41577-019-0257-x
 28. Sakaguchi A., Horimoto Y., Onagi H. et al. Plasma cell infiltration and treatment effect in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2021;23(1):99. DOI: 10.1186/s13058-021-01477-w
 29. Qin G., Wang X., Ye S. et al. NPM1 upregulates the transcription of PD-L1 and suppresses T cell activity in triple-negative breast cancer. *Nat Commun* 2020;11(1):1669. DOI: 10.1038/s41467-020-15364-z
 30. Johansson A.L.V., Trewin C.B., Hjerkind K.V. et al. Breast cancer-specific survival by clinical subtype after 7 years follow-up of young and elderly women in a nationwide cohort. *Int J Cancer* 2019;144(6):1251–61. DOI: 10.1002/ijc.31950
 31. Yersal O., Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol* 2014;5(3):412–24. DOI: 10.5306/wjco.v5.i3.412
 32. Hurvitz S.A., McAndrew N.P., Bardia A. et al. A careful reassessment of anthracycline use in curable breast cancer. *NPJ Breast Cancer* 2021;7(1):134. DOI: 10.1038/s41523-021-00342-5
 33. Saraiva D.P., Correia B.F., Salvador R. et al. Circulating low density neutrophils of breast cancer patients are associated with their worse prognosis due to the impairment of T cell responses. *Oncotarget* 2021;12(24):2388–403. DOI: 10.18632/oncotarget.28135
 34. Khalaf K., Hana D., Chou J.T.-T. et al. Aspects of the tumor microenvironment involved in immune resistance and drug resistance. *Front Immunol* 2021;12:656364. DOI: 10.3389/fimmu.2021.656364
 35. Castells M., Thibault B., Delord J.P., Couderc B. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. *Int J Mol Sci* 2012;13(8):9545–71. DOI: 10.3390/ijms13089545
 36. Dauer P., Nomura A., Saluja A., Banerjee S. Microenvironment in determining chemo-resistance in pancreatic cancer: neighborhood matters. *Pancreatology* 2017;17(1):7–12. DOI: 10.1016/j.pan.2016.12.010
 37. Tang N., Wang L., Esko J. et al. Loss of HIF-1 α in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell* 2004;6(5):485–95. DOI: 10.1016/j.ccr.2004.09.026
 38. Tafliin C., Favier B., Baudhuin J. et al. Human endothelial cells generate Th17 and regulatory T cells under inflammatory conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(7):2891–96. DOI: 10.1073/pnas.1011811108
 39. Komarova S., Kawakami Y., Stoff-Khalili M.A. et al. Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Mole Cancer Ther* 2006;5:755–66. DOI: 10.1158/1535-7163.mct-05-0334

40. Chen L., Tredget E.E., Wu P.Y., Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PloS One* 2008;3(4):e1886. DOI: 10.1371/journal.pone.0001886
41. Aldinucci D., Colombatti A. The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression. *Mediators Inflamm* 2014;2014:292376. DOI: 10.1155/2014/292376
42. Kuperwasser C., Chavarria T., Wu M. et al. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(14):4966–71. DOI: 10.1073/pnas.0401064101
43. Takahashi H., Sakakura K., Kudo T. et al. Cancer-associated fibroblasts promote an immunosuppressive microenvironment through the induction and accumulation of protumoral macrophages. *Oncotarget* 2017;8(5):8633–47. DOI: 10.18632/oncotarget.14374
44. Zhou B.-B.S., Zhang H., Damelin M. et al. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8(10):806–23. DOI: 10.1038/nrd2137
45. Boyd A.S.; Rodrigues N.P. Stem cells cycle toward immune surveillance. *Immunity* 2018;48(2):187–90. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.02.006
46. Jiang E., Yan T., Xu Z., Shang Z. Tumor microenvironment and cell fusion. *Biomed Res Int* 2019;2019:5013592. DOI: 10.1155/2019/5013592
47. Solinas G., Germano G., Mantovani A., Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 2009;86(5):1065–73. DOI: 10.1189/jlb.0609385
48. Haqqani A.S., Sandhu J.K., Birnboim H.C. Expression of interleukin-8 promotes neutrophil infiltration and genetic instability in mutatact tumors. *Neoplasia* 2000;2(6):561–8. DOI: 10.1038/sj.neo.7900110
49. Bharadwaj U., Li M., Zhang R. et al. Elevated interleukin-6 and G-CSF in human pancreatic cancer cell conditioned medium suppress dendritic cell differentiation and activation. *Cancer Res* 2007;67(11):5479–88. DOI: 10.1158/0008-5472.can-06-3963
50. Wilson E.B., El-Jawhari J.J., Neilson A.L. et al. Human tumour immune evasion *via* TGF- β blocks NK cell activation but not survival allowing therapeutic restoration of anti-tumour activity. *PloS One* 2011;6(9):e22842. DOI: 10.1371/journal.pone.0022842
51. Olkhanud P.B., Damdinsuren B., Bodogai M. et al. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4⁺ T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res* 2011;71(10):3505–3515. DOI: 10.1158/0008-5472.can-10-4316
52. Fujimura T., Kambayashi Y., Aiba S. Crosstalk between regulatory T cells (Tregs) and myeloid derived suppressor cells (MDSCs) during melanoma growth. *Oncoimmunology* 2012;1(8):1433–4. DOI: 10.4161/onci.21176
53. Lu H., Clauser K.R., Tam W.L. et al. A breast cancer stem cell niche supported by juxtacrine signalling from monocytes and macrophages. *Nat Cell Biol* 2014;16(11):1105–17. DOI: 10.1038/ncb3041
54. Li I., Nabet B.Y. Exosomes in the tumor microenvironment as mediators of cancer therapy resistance. *Mol Cancer* 2019;18(1):32. DOI: 10.1186/s12943-019-0975-5

Вклад авторов

П.М. Соколов: сбор и анализ данных литературы, написание текста статьи;

А.В. Караулов: анализ данных литературы;

А.В. Суханова: анализ источников литературы;

И.Р. Набиев: дизайн обзора, экспертный анализ текста.

Authors contributions

P.M. Sokolov: collection and analysis of literature data, article writing;

A.V. Karaulov: analysis of literature data;

A.V. Sukhanova: analysis of literature data;

I.R. Nabiev: design of the review, final expertize of the text.

ORCID авторов / ORCID of authors

П.М. Соколов / P.M. Sokolov: <https://orcid.org/0000-0001-5321-3753>

А.В. Караулов / A.M. Karaulov: <https://orcid.org/0000-0002-1930-5424>

А.В. Суханова / A.V. Sukhanova: <https://orcid.org/0000-0003-2796-7898>

И.Р. Набиев / I.R. Nabiev: <https://orcid.org/0000-0002-8391-040X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Данная работа была поддержана грантом № 075-15-2021-937 (проект NanoToBio) Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Funding. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation through the grant No. 075-15-2021-937 (NanoToBio project).

Статья поступила: 28.08.2022. Принята к публикации: 05.12.2022.

Article received: 28.08.2022. Accepted for publication: 05.12.2022.

Особенности методов анализа, оценки и контроля рисков в фармацевтической разработке

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

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова»; Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8

Контакты: Сергей Валерьевич Тишков sergey-tishkov@ya.ru

Управление риском для качества (Quality Risk Management, QRM) представляет собой важный аспект фармацевтической разработки в парадигме «качество путем разработки или проектирования» (Quality-by-Design), поскольку определяет проектное поле (design space), критические показатели качества и критические показатели процесса.

Цель настоящего обзора состоит в систематизации и анализе основных аспектов системы QRM применительно к каждому элементу фармацевтической разработки. В данной обзорной статье рассматриваются следующие ключевые элементы QRM: анализ риска, контроль риска, информирование о рисках, проверка риска. Для анализа рисков приведены и проанализированы преимущества и недостатки таких инструментов QRM, как предварительный анализ опасностей (Preliminary Hazard Analysis), анализ видов и последствий отказов (Failure Mode Effects Analysis), анализ дерева отказов (Fault Tree Analysis), анализ опасностей и эксплуатационности (Hazard Operability Analysis) и анализ опасностей и критические контрольные точки (Hazard Analysis and Critical Control Points). Кроме того, приводится описание методов математического планирования и проектирования (планирования) экспериментов (Design of Experiments) для фармацевтической разработки и QRM и определяется их значение для данных систем. В качестве инструментов контроля и снижения рисков приведены такие элементы QRM, как анализ первопричин, мозговой штурм и процедура корректирующих и предупреждающих действий. В работе рассмотрены ключевые этапы QRM и сформулированы выводы относительно основных преимуществ и недостатков методов анализа, контроля, донесения риска и предложены направления дальнейшего совершенствования представленной системы.

Ключевые слова: фармацевтическая разработка, управление рисками для качества, анализ рисков, контроль рисков, корректирующие и предупреждающие действия

Для цитирования: Тишков С.В., Блынская Е.В., Алексеев К.В., Алексеев В.К. Особенности методов анализа, оценки и контроля рисков в фармацевтической разработке. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(1): 28–41. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-28-41

Features of risk analysis, assessment and control methods in pharmaceutical development

Sergey V. Tishkov, Evgenia V. Blynskaya, Konstantin V. Alekseev, Viktor K. Alekseev

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

Contacts: Sergey Valeryevich Tishkov sergey-tishkov@ya.ru

Quality Risk Management (QRM) is an important aspect of pharmaceutical development in the Quality-by-Design paradigm, since it determines the Design Space, critical quality attributes and critical process attributes.

The purpose of this review is to systematize and analyze the main aspects of the QRM system in relation to each element of pharmaceutical development. This review article discusses the following key elements of QRM such as: risk analysis, risk control, risk communication, risk verification. For risk analysis, the advantages and disadvantages of QRM tools such as Preliminary Hazard Analysis, Failure Mode Effects Analysis, Fault Tree Analysis are presented and analyzed, Hazard Operability Analysis and Hazard Analysis and Critical Control Points. In addition, a description of the methods of mathematical planning and design of experiments for pharmaceutical development and QRM is given and their significance for these systems is determined. Elements of QRM such as root cause analysis, brainstorming, and a corrective and preventive action procedure are given as risk control and mitigation tools.

In this paper, the main stages of QRM are considered and conclusions are formulated regarding the main advantages and disadvantages of the methods of identification, analysis, control, risk reporting, and the main ways for further improvement of the presented system are proposed.

Keywords: pharmaceutical development, quality risk management, risk analysis, risk control, corrective and preventive actions

For citation: Tishkov S.V., Blynskaya E.V., Alekseev K.V., Alekseev V.K. Features of risk analysis, assessment and control methods in pharmaceutical development. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(1):28–41. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-28-41

Введение

В парадигме «качество путем разработки или проектирования» (Quality-by-Design) рабочие характеристики состава, технологического процесса и упаковки заранее определены в целевом профиле качества препарата (ЦПКП). В сочетании с предварительно полученными данными и наработками разработчиков ЦПКП помогает определить критические показатели качества (КПК) разрабатываемого лекарственного средства (ЛС) и критические показатели процесса (КПП) его получения. Первоначальная оценка рисков (или совокупного риска, т. е. результирующего риска в целом, полученного на основе оценки индивидуальных видов риска и их воздействий), которая выявляет возможные опасности для КПК, позволяет определить начальные параметры для разработки лекарственной формы (ЛФ). Исследования, направленные на подбор состава ЛФ и технологического процесса, предназначены для получения информации о представленных рисках, разработки стратегий по устранению или смягчению данных рисков и достижения целей, установленных в ЦПКП. В целом риск-ориентированный подход позволяет концентрировать внимание на событиях более высокой степени риска, тем самым повышая уровень защиты пациента. Научно обоснованный технологический процесс увеличивает прозрачность и надежность получения ЛФ. Ориентация на риск для пациента вместе с гибким подходом к разработке экономит исследовательские и производственные ресурсы, повышает уверенность в качестве и снижает риск несоблюдения требований разработчика при дальнейшем масштабировании и трансфере производства. Знания, полученные при анализе рисков для КПК и КПП, позволяют построить осмысленное проектное поле, или, по-другому, пространство проектных параметров (Design Space). В рамках проектного поля необходимо управлять изменением критических характеристик материала и параметров процесса, чтобы получить продукт с заданными характеристиками [1–8].

Цель обзора – рассмотреть и проанализировать современные подходы к управлению рисками и их взаимосвязь с целевыми профилями качества лекарственного препарата (ЛП) и проектного поля фармацевтической разработки оригинальных и воспроиз-

изведенных ЛП. В статье представлены методы анализа, снижения, принятия рисков, информирования о рисках, а также особенности данных элементов управления рисками для качества (Quality Risk Management, QRM) при разработке готовых ЛФ.

Анализ риска

После оценки риска проводится его анализ с точки зрения вероятности возникновения и влияния его (серьезности) на качество, стоимость, здоровье пациента, комплаенс и продолжительность технологического процесса [3]. Рискам присваивается балльная оценка и строится матрица «вероятность – воздействие» для установления приоритетов. Впоследствии данная матрица используется в процессе QRM для соответствующих действий по снижению рисков.

Вероятность возникновения рисков выводится в основном из данных, полученных другими исследовательскими группами для данного или схожего ЛП, и опыта осуществления схожих технологических процессов, что подчеркивает необходимость доступных и надежных источников информации. Ввиду отсутствия фиксированных международных стандартов для определения критериев серьезности (тяжести вреда) и вероятности возникновения рисков их оценивают, используя качественные, полуколичественные или количественные шкалы. Качественный анализ экономичен и прост в выполнении, однако количественный анализ более точен и обеспечивает четкую дифференциацию и приоритизацию рисков. **Вероятность** возникновения риска оценивают качественно (по степени – «высокая», «средняя» или «низкая»), полуколичественно (например, «1 раз в день») и количественно (например, «каждый 10-й случай»). В то время как **тяжесть** вреда определяют качественно («очень высокая», «высокая», «средняя» или «низкая») и полуколичественно (например, «убыток >5000» и т. п.) [9–11]. Критерии оценки могут варьировать от одной организации к другой, в одной и той же организации критерии должны быть едиными и представлены в «плане управления рисками» предприятия. В данном документе отражают обоснование оценки рисков и указывают критерии для проведения количественного анализа рисков и методы анализа.

Методы анализа рисков хорошо описаны в руководстве, подготовленном на международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для использования человеком (ICH), Q9 и включают предварительный анализ опасностей (Preliminary Hazard Analysis, PHA) [12], анализ видов и последствий/критичности отказов (Failure Mode Effects/Criticality Analysis, FMEA/FMECA) [13, 14], анализ дерева отказов (Fault Tree Analysis, FTA) [15], анализ опасностей и эксплуатационности (Hazard Operability Analysis, HAZOP) [16] и анализ опасностей и критические контрольные точки (Hazard Analysis and Critical Control Points, HACCP) [17].

Предварительный анализ опасностей является широко используемым полуколичественным инструментом для выявления опасностей на ранних стадиях проекта путем ранжирования их в соответствии с создаваемым риском. Затем используется матрица ранжирования рисков, чтобы классифицировать риски как высокие, средние и низкие (табл. 1, 2).

Анализ видов и последствий отказов (FMEA/FMECA) представляет собой инструмент для систематической идентификации последствий рисков состава или процесса, определения приоритетов и корректирующих действий. Методом FMEA осуществляется оценка потенциальных режимов сбоя процессов

Таблица 1. Оценка риска на основе предварительного анализа опасностей (PHA)

Table 1. Risk assessment based on preliminary hazard analysis (PHA)

Серьезность (тяжесть последствий) Severity (severity of consequences)	Уровень Rank score	Вероятность Probability	Уровень Rank score
Незначительная (без травм персонала): не влияет на критические показатели качества лекарственной формы Minor (no personal injury): does not affect the critical quality attributes of dosage form	1	Очень маловероятно, но возможно: 1 раз/каждые 100 лет или реже Very unlikely, but possible: once/every 100 years or less	1
Средняя (низкий уровень травматизма): отклонение, переделка, потеря доверия клиентов Medium (low injury rate): deviation, rework, loss of customer confidence	2	Отдаленная (маловероятно, но ожидается): 1 раз/каждые 10 лет Distant (unlikely but expected): once/every 10 years	2
Критическая (легкий вред пациенту): производство останавливается (простой по орга- низационно-техническим причинам) Critical (mild harm to the patient): production stopped (downtime for organizational and technical reasons)	3	Иногда (появляется несколько раз): 1 раз в год Sometimes (appears several times): once a year	3
Катастрофическая (серьезный вред или смерть пациентов): отзыв продукта, потеря клиента/ повторный заказ Catastrophic (serious harm or death of patients): product recall, loss of customer/reorder	4	Вероятно (часто): 1 раз в месяц Часто (постоянное возникновение): >1 раза в месяц Probably (often): once a month Frequent (constant occurrence): >1 time per month	4

Таблица 2. Матрица уровней риска на основе предварительного анализа опасностей (PHA)

Table 2. Risk ranking matrix based on preliminary hazard analysis (PHA)

Серьезность (тяжесть последствий) Severity (severity of consequences)	Уровень риска по уровням вероятности (1–5) Risk ranking by probability levels (1–5)				
	1	2	3	4	5
Катастрофическая Catastrophic	Средний Medium	Высокий High	Высокий High	Высокий High	Высокий High
Критическая Critical	Низкий Low	Средний Medium	Средний Medium	Высокий High	Высокий High
Основная Major	Низкий Low	Низкий Low	Средний Medium	Средний Medium	Высокий High
Незначительная Minor	Низкий Low	Низкий Low	Низкий Low	Средний Medium	Средний Medium

и их вероятного влияния на исходы и/или поведение ЛП. FMEA можно расширить, включив в него изучение степени тяжести последствий, вероятности возникновения и их обнаруживаемости, для преобразования этого метода в FMECA. Данный инструмент используют для определения приоритетности рисков, в частности с помощью номера приоритета риска (НПР). Указанные методы анализа выполняются путем создания электронной таблицы со столбцами, отражающими режим, частоту и степень отказа, серьезность, вероятность, способность обнаружения, НПР, как показано в табл. 3, 4. НПР является достаточно гибким способом оценки общего воздействия риска и рассчитывается путем умножения вероятности, серьезности (тяжести последствий) и обнаруживаемости проблемы [13, 14].

В табл. 3, 4 приведен пример анализа FMEA для КПК при приготовлении таблеток диклофенака, диспергируемых в полости рта, в котором для каждого риска рассчитан НПР [18].

Метод HAZOP основан на предположении, что события риска вызваны отклонениями от проекта или эксплуатационных требований. Данный инструмент использует систематизированный подход к мозговому штурму для выявления опасностей при помощи ключевых слов или слов-ориентиров. Направляющие слова (например, «нет», «больше», «отличный от»,

«часть» и т. д.) применяются к соответствующим параметрам (например, расходу воды очищенной, температуре, давлению) для определения потенциальных отклонений от установленных стандартных значений использования или проектных назначений.

Анализ дерева отказов (FTA) представляет собой дедуктивный метод, который оценивает сбои системы (или подсистемы) по одному за раз, но может выявлять воздействия нескольких причин сбоя путем нахождения причинно-следственных цепочек (в виде алгоритма видов сбоев) с желаемыми уровнем детализации или системой. Представленный метод можно использовать для анализа опасностей, уже выявленных с помощью других методов. С помощью FTA можно проводить количественный анализ, если доступны данные о частоте сбоев или отказов [15].

Еще одним методом анализа рисков является НАССР, который представляет собой систематизированный упреждающий инструмент управления рисками, ориентированный на производственные процессы. Процесс основан на идентификации критических контрольных точек и поддержании контроля, работы в допустимых диапазонах для предотвращения возникновения опасностей.

Кроме того, в качестве инструментов анализа рисков используют ранжирование и фильтрацию рисков, анализ уровня защиты, анализ контрольных

Таблица 3. Анализ видов и последствий отказов (FMEA) для получения номера приоритета риска (НПР)

Table 3. Failure mode effects analysis (FMEA) to obtain risk priority number (RPN)

Режим отказа Failure mode	Причина Cause	Следствие Consequence	Серьезность (тяжесть последствий) Severity (severity of consequences)	Вероятность Probability	Обнаруживаемость Detectability	НПР RPN
Время смешивания перед добавлением смазывающего вспомогательного вещества Mixing time before addition of lubricating	Время, скорость, размер партии Time, speed, lot size	Неоднородность Nonuniform	3	3	4	36
Опудривание смазывающим вспомогательным веществом Dusting with a lubricating excipient	Время, скорость Time, speed	Неоднородность Nonuniform	3	5	4	60
Объем серии Volume of the series	Масштабирование не учитывается при разработке Scaling is not considered in development	Неоднородность Nonuniform	3	3	4	36
Прочность таблеток Tablet strength	Параметры прессования Pressing parameters	Увеличение Increase	3	5	3	45
Скорость таблетирования Tableting rate	Вибрации, сила сжатия, скорость Vibrations, compressive force, speed	Неоднородность Nonuniform	3	2	4	24

Таблица 4. Ранжирование риска согласно анализу видов и последствий отказов (FMEA)

Table 4. Risk ranking according to failure mode effects analysis (FMEA)

Критерий Criteria	Ранжирование риска Risk ranking				
	1	2	3	4	5
Серьезность (тяжесть последствий) Severity (severity of consequences)	Отклонение от параметров в рамках допустимого Deviation from parameters within permissible range	Прохождение повторного испытания Passed the retest	Отклонение партии Rejected batch	Остановка производства (время простоя) Stop manufacturing (downtime)	Отзыв партии Batch recall
Вероятность Probability	Не более чем 1 раз на 10 000 серий No more than once per 10,000 lots	Не более чем 1 раз на 1000 серий и не менее чем 1 раз на 10 000 серий No more than once per 1000 lots and no less than once per 10,000 lots	Не более чем 1 раз на 100 серий и не менее чем 1 раз на 1000 серий No more than once per 100 lots and no less than once per 1000 lots	Не более чем 1 раз на 10 серий и не менее чем 1 раз на 100 серий No more than once for 10 lots and no less than once for 100 lots	Не менее чем 1 раз за 10 серий At least once in 10 lots
Обнаруживаемость Detectability	Перед каждой операцией Before each operation	Во время работы During a unit operation	Во время серии единичных операций During series of unit operations	Испытание конечного лекарственного препарата Test of the final product	Может быть найдено только клиентами Found by customers

списков, схем, диаграмм, метод Парето и т. д., однако зачастую данные методы играют вспомогательную роль.

Преимущества, недостатки и принципы основных методов анализа рисков обобщены в табл. 5.

Оценка риска(ов)

Идентифицированный и проанализированный риск сравнивают с заданными критериями на этапе его оценки с использованием количественной или качественной шкалы для определения значимости [3]. Последствия выявляют путем оценки воздействия риска(ов) и вероятности его возникновения. Результатом оценки риска(ов) является количественное значение или качественное описание диапазона риска(ов), в случае его количественного выражения используется численная вероятность. Информацию, полученную в ходе анализа, организуют таким образом, чтобы отделить неприемлемые риски от допустимых. Риск следует допускать только в том случае, если в этом есть явная выгода для пациента, и должно быть показано, что стоимость дальнейшего снижения риска(ов) существенно отразится на конечной стоимости ЛП. Риски классифицируют как неприемлемые, в целом приемлемые и допустимые. Критические или неприемлемые риски идентифицируют для их снижения, а допустимые (незначительные низкие риски), которые хорошо контролируются, принимаются в качестве остаточных рисков на основании уверенности в том, что они должным образом

контролируются. Неприемлемые риски должны быть либо устранены, либо снижены до приемлемого или допустимого уровня. Критерии допустимого риска(ов) определяются нормативными документами, стандартами. Подобные критерии согласовывают со всеми заинтересованными сторонами. Результаты оценки риска(ов) документируются в виде заявлений об обосновании безопасности с обоснованием приемлемости остаточного риска(ов) и необходимости его снижения [19].

Оценка риска(ов) постоянно пересматривается по мере накопления данных для поддержания остаточного риска(ов) на минимально допустимом уровне.

Отношение КПК, выявленных в результате оценки риска(ов), к критическим характеристикам материала на единицу операций устанавливается многовариантным экспериментальным планом [20]. Эксперименты разрабатываются с использованием методов проектирования (планирования) экспериментов (Design of Experiments, DOE) для оптимизации процесса фармацевтической разработки и увеличения объема поступающих данных при сокращении количества экспериментов. Основные методы DOE или математического планирования включают в себя факторный дизайн (факторный эксперимент), план Плакетта–Бермана и методы композиционного (последовательного) планирования, а также комбинации с ними методов математического анализа (дисперсионный, регрессионный, корреляционный анализ

Таблица 5. Преимущества, недостатки и принцип методов анализа риска(ов)
Table 5. Advantages, disadvantages and principle of risk analysis methods

Инструмент анализа рисков Risk analysis tool	Преимущества Advantages	Недостатки Disadvantages	Принципы Principles
1 РНА	2 <ul style="list-style-type: none"> • Легко внедрить на ранних этапах осуществления проекта, при наличии ограниченного количества информации Easy to implement early in the project, with limited information • Систематически выявляет и расставляет приоритеты по рискам Systematically identifies and prioritizes risks • Визуальное представление рисков Visual representation of risks • Простота выполнения, реализации и внесения корректировок Ease of implementation, implementation and adjustment • Небольшое количество необходимых данных Small amount of data required 	3 <ul style="list-style-type: none"> • Используется только для предварительного анализа Used only for preliminary analysis • Низкая информативность Low information content • Вероятность обеспечения потребности при расстановке приоритетов Probability of ensuring error during prioritization • Идентифицирует только основные опасности Identifies only major hazards • Сложность выявления взаимодействия опасностей (факторов риска(ов)) между собой Difficulty in identifying the interaction of hazards (risk factors) with each other 	4 <ul style="list-style-type: none"> • Оценивается серьезность причинения вреда и вероятность риска(ов) Severity of harm and probability of risk are assessed
FTA	<ul style="list-style-type: none"> • Визуальное представление путей сбоя функциональности или процесса A visual representation of the failure paths of the functionality or process • Логически анализируются причины рисков The causes of risks are logically analyzed • Определяет широкий спектр факторов, вызывающих отказ системы Defines a wide range of factors causing system failure • Может обрабатывать сложные процессы Can handle complex processes • Может использоваться перспективно и ретроспективно Can be used in perspective and retrospect • Выявляются потенциальные режимы отказа для данного процесса или ЛС Potential failure modes for a given process or drug are identified • Может использоваться отдельно или совместно с другими процессами Can be used alone or in conjunction with other processes 	<ul style="list-style-type: none"> • Возможен пропуск некоторых событий, может потребоваться проведение некоторых дополнительных исследований It is possible to skip some events, some additional studies may need to be carried out • Требуется большое количество времени, отличается высокой стоимостью и большим объемом требуемой информации Time consuming, expensive and requires significant information • Требуется значительный опыт и обучение для получения значимых результатов Considerable experience and training is required to achieve meaningful results • Узкая направленность метода Narrow focus of the method 	<ul style="list-style-type: none"> • Представляет опасности графически Graphically presents hazards • Использует логические элементы для поиска опасностей Uses logical elements to find hazards • На каждом уровне дерева комбинации неисправностей описываются с помощью логических операторов (И, ИЛИ и т.д.) At each tree level, fault combinations are described using logical operators (AND, OR, etc.) • Оценивает свои системы по одному, но имеет возможность комбинировать несколько причин сбоев Estimates system failures one at a time, but has the ability to combine several causes of failures • Предполагает понимание процесса экспертами Relies on experts to understand the process

Продолжение табл. 5
Continuation of table 5

1	2	3	4
<p>FMEA/ FMECA</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Выявляются потенциальные режимы отказа для данного процесса или продукта Potential failure modes for a given process or product are identified • Может использоваться отдельно или с другими процессами Can be used alone or with other processes • Благодаря НПР имеется отчетливое представление о рисках With the help of RPNs, there is a clear picture of the risks • В метод включена система контроля для повторной оценки потенциальных опасностей The method includes a monitoring system to re-evaluate potential hazards • Могут быть предприняты корректирующие действия Corrective actions can be taken to eliminate risks or continuously reduce their potential occurrence • Подход «от больших рисков к меньшим» сводит к минимуму непредвиденные сбои The “from greater to lesser” approach minimizes unexpected failures 	<ul style="list-style-type: none"> • Отнимает много времени, дорого-стоящий и требует значительного количества данных Time consuming, costly and requires a significant amount of data • Сложность оценки опасностей за счет учета множественных рисков Difficulty in assessing hazards by considering multiple risks • Требуется значительной компетентности и обучения пользователя Requires significant user expertise and training • Существует вероятность ошибки при интерпретации результатов There is a possibility of error in interpreting the results • Три компонента НПР: вероятность, тяжесть и обнаруживаемость не имеют одинакового веса. Вероятность и обнаруживаемость имеют обратную корреляционную зависимость The three components of RPN: likelihood, severity and detectability are not equally weighted. Probability and detectability are inversely correlated 	<ul style="list-style-type: none"> • Определяет потенциальные опасности и их вероятное влияние на производительность Identifies potential hazards and their likely impact on performance • Предполагает понимание ЛС и процесса Relies on understanding the drug and process • Выходной НПР генерируется путем умножения показателей серьезности, вероятности и обнаруживаемости The output RPN is generated by multiplying the severity, probability and detectability indicators • Стратегии снижения риска(ов) используются для снижения НПР до желаемого значения Risk reduction strategies are used to reduce RPN to the desired value
<p>Контрольные диаграммы, диаграммы Шухарта и Парето Control diagrams, Shuhart and Pareto diagrams</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Достаточно простые и непроблемные инструменты Relatively simple and undemanding tools • Могут быть быстро созданы с помощью простого программного обеспечения, такого как MS Excel Can be quickly created with simple software such as MS Excel • Визуальное представление тенденций, закономерностей или состояния контроля позволяет их легко проанализировать Visual representation of trends, patterns or control status allows them to be easily analyzed • Не требуют большой подготовки персонала Does not require much staff training • Методы основаны на статистике The method is based on statistics • Диаграмму Парето можно использовать с другими инструментами для определения уровней допустимого риска(ов) The Pareto chart can be used with other tools to determine levels of acceptable risk 	<ul style="list-style-type: none"> • Нужен дополнительный инструмент анализа рисков An additional risk analysis tool is needed • Можем применяться к процессам, поддающимся статистической оценке Can be applied to processes that can be statistically evaluated. • Результаты могут быть необъективными, поскольку они зависят от метода измерения Results may not be objective as they depend on the measurement method 	<ul style="list-style-type: none"> • Диаграммы определяют, находится ли процесс в состоянии статистического контроля Graphs determine if the process is in Statistical Control • Диаграмма Шухарта выделяет особые причины отклонений от стандартных значений и может помочь в прогнозировании будущего процесса The Shewhart chart highlights specific causes of deviations from standard values and can help predict the future process • Инструменты для анализа рисков, связанных с технологическим процессом Tools for risk analysis associated with the process

1	2	3	4
<p>Контрольные диаграммы, диаграммы Шухарта и Парето Control diagrams, Shuhart and Pareto diagrams</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Показывает наличие потенциального влияния причины, но не определяет первопричину Indicates the potential influence of a cause, but does not identify the root cause • Требуется статистически значимое количество точек данных для предоставления полезной информации Requires a statistically significant number of data points to provide useful information 	<ul style="list-style-type: none"> • Методы основаны на графическом сравнении и определении приоритетов причин проблем в порядке убывания Methods based on graphical comparison and prioritization of problem causes in descending order • Принцип Парето основан на том факте, что большинство следствий (80 %) происходят от 20 % причин The Pareto principle is based on the fact that most effects (80 %) come from 20 % of causes
<p>НАССР</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Упреждающий инструмент, который можно использовать как для оценки риска(ов), так и для контроля риска(ов). Определяет критические контрольные точки в технологическом процессе A proactive tool that can be used for both risk assessment and risk control. Identifies critical control points in a workflow • Метод также можно использовать на этапе снижения риска(ов) The method can also be used in the risk reduction phase • Мониторинг критических контрольных точек способствует быстрому обнаружению ошибок, а действия по исправлению служат быстрым ориентиром для решения проблем Monitoring of critical control points helps to quickly detect errors, and corrective actions provide a quick guideline for problem resolution • Может справляться со сложными ситуациями, связанными с большим объемом данных Can handle complex situations involving large amounts of data 	<ul style="list-style-type: none"> • Имеет высокие продолжительность, стоимость и требует внешнего обучения Has a high duration, cost and requires external training • В первую очередь, подходит для оценки производственных процессов и рисков загрязнения и используется в модификации для другого применения Primarily suitable for assessing manufacturing processes and contamination risks and needs to be modified for other applications • Метод необходимо сочетать с другими инструментами для количественной оценки и классификации уровня рисков The method needs to be combined with other tools to quantify and classify the level of risk 	<ul style="list-style-type: none"> • Цель — уменьшить акцент на испытанных лекарственной формы в конце технологического процесса, так как сложнее обнаружить Objective — to reduce the emphasis on dosage form testing at the end of the process, as harder to spot the inconsistency • Состоит из 7 ключевых этапов: Consists of 7 key steps: <ol style="list-style-type: none"> 1) проведение аналитических мер на каждом этапе процесса; conducting a hazard analysis and identifying preventive measures at each stage of the process; 2) определение ККТ; definitions of (critical control points) CCP; 3) установление целевых уровней и критических пределов; setting target levels and critical limits; 4) установление системы мониторинга ККТ; establishment of a CCP monitoring system; 5) установление корректирующего действия, принимаемого в случае, если мониторинг показывает, что ККТ не находится под контролем; establish corrective action to be taken if monitoring indicates that the CCP is not under control;

Окончание табл. 5
The end of table 5

1	2	3	4
НАССР	<ul style="list-style-type: none"> • Возможность идентификации критических операций для управления рисками Ability to identify critical risk management activities • Способствует регулярному мониторингу критических точек в процессе производства Facilitates regular monitoring of critical points during production 	<ul style="list-style-type: none"> • Требуется значительный объем информации и большое количество усилий и времени A lot of information and a lot of effort and time are required • В процессе учитываются опасности только от одного компонента. Процесс не рассматривает взаимодействия между несколькими опасностями The process takes into account hazards from only one component. The process does not consider interactions between multiple hazards 	<ul style="list-style-type: none"> 6) создание системы для проверки эффективности работы системы НАССР; creation of a system for checking the effectiveness of the HACCP system; 7) создание системы хранения документации creation of a documentation storage system
HAZOP			<ul style="list-style-type: none"> • Инструмент предполагает, что события риска(ов) вызваны отклонениями от проектных и эксплуатационных целей The tool assumes that risk events are caused by deviations from design and operational targets • Использует систематический метод для выявления потенциальных отклонений заданных значений Uses a systematic method to identify potential deviations of given values

Примечание. РНА – предварительный анализ опасностей; FTA – анализ дерева отказов; FMEA/ФМЕСА – анализ видов и последствий отказов; НАССР – анализ опасностей и критические контрольные точки; HAZOP – анализ опасностей и эксплуатационности; ЛС – лекарственное средство; НПП – номер приоритета риска; ККТ – критические контрольные точки.

Note. РНА – preliminary hazard analysis; FTA – fault tree analysis; FMEA/ФМЕСА – failure mode effects analysis; НАССР – hazard analysis and critical control points; HAZOP – hazard operability analysis; NPR – risk priority number; CCP – critical control points.

и т.д.). Влияние факторов и их взаимодействие можно легко оценить с помощью полного факторного планирования. Факторы изменяются независимо на двух или более уровнях, и эффект, обусловленный каждым фактором и взаимодействием, оценивается с максимальной эффективностью, не смешиваясь с другими экспериментальными данными и случайными факторами [21, 22].

Дробный факторный дизайн и планы Плакетта–Бермана используются для скрининга на ранних этапах работы, когда основное внимание уделяется только основным эффектам, и позволяют тестировать большое количество факторов. В данных DOE основные эффекты смешиваются с их взаимодействием. Центральный композиционный план представляет собой факторный или дробный факторный план с центральными и звездообразными точками для оценки кривизны и поверхности отклика [21, 22].

Контроль риска(ов)

Контроль риска(ов) представляет собой деятельность по выработке решений по снижению и/или принятию остаточного риска(ов) и осуществляется разработчиками или компетентными органами. Данные решения основываются на приемлемом уровне риска(ов), способах его снижения, соответствующем балансе между выгодами, ущербом, доступными ресурсами и возможностью идентификации новых рисков во время его контроля. Неидентифицированные

риски и опасности, не связанные с пациентом, обычно принимаются как остаточный риск. Для QRM характерен приоритет в сторону устранения и снижения риска(ов) по сравнению с возможностью его принятия. Приемлемость риска(ов) определяется нормативными ограничениями, стандартами, технической осуществимостью и экспериментальными данными. Принятые решения и действия документируются, анализируются и утверждаются.

Снижение риска(ов). Снижением риска(ов) является упреждающая стратегия контроля риска(ов) для уменьшения воздействия (тяжести) и вероятности возникновения опасности [3]. Для каждого контролируемого критического риска(ов) должны быть указаны критерии приемлемости. После оценки рисков по их критериям приемлемости принимаются соответствующие меры для устранения или снижения высоких рисков с использованием таких инструментов, как анализ первопричин (Root Cause Analysis, RCA), мозговой штурм и процедура корректирующих и предупреждающих действий (Corrective Action and Preventive Action, CAPA). Метод RCA помогает в оперативном выявлении и устранении первопричин риска(ов), а также позволяет проводить мониторинг критических этапов для предотвращения повторного возникновения



Рис. 1. Этапы проведения анализа первопричин

Fig. 1. Steps for conducting a root cause analysis

риска(ов) [23, 24]. Этапы осуществления указанного вида анализа отражены на рис. 1.

Отчет RCA включает разделы, описывающие ответственность, действия, которые необходимо предпринять, графики и цель их выполнения. Данный метод часто используется в комбинации с CAPA.

Метод CAPA представляет собой корректирующие действия, направленные на обеспечение исправления и оптимизацию процессов, предпринимаемые для устранения причин несоответствий или других нежелательных ситуаций. Данная система является совокупностью решений, нормативных актов, документации, процедур или систем для устранения повторяющихся несоответствий. Несоответствие выявляется после систематической оценки и RCA.

Преимущества использования системы CAPA для снижения риска(ов): 1) устранение опасностей, вызывающих риск; 2) предотвращение повторения и 3) обеспечение постоянного улучшения процесса [25]. Элементы CAPA представлены на рис. 2.

После оценки остаточного риска(ов) и его приемлемости предлагается стратегия контроля. Стратегия контроля остаточного риска(ов) включает в себя КПК фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ, условия эксплуатации помещений и оборудования, контроль технологического процесса, спецификации и связанные методы, а также частоту мониторинга и контроля [4]. В табл. 6 перечислены возможные факторы риска(ов) для различных КПК таблетированных ЛФ.

Принятие риска(ов). Решение о принятии последствий риска(ов) утверждают разработчики ЛС в случае невозможности дальнейшего снижения риска(ов). Ключевым звеном принятия риска(ов) являются средства его контроля [3]. Любые изменения в процессе повлекут за собой пересмотр критериев приемлемости риска(ов) и повторную оценку рисков в соответствии с новыми изменениями.

Донесение риска(ов) (информирование о рисках)

Обмен информацией о рисках между различными заинтересованными сторонами лежит в основе QRM [3]. Информация передается на всех этапах процесса для обеспечения ясности логики, значимости и ограничений оценки риска(ов). Результат QRM должен быть должным образом задокументирован и донесен всем заинтересованным сторонам – регулятору, заказчику, участникам разработки – в пределах компании, отрасли и т.д. От данной составляющей QRM напрямую зависит эффективность и действенность системы. Соответствующие заинтересованные стороны оказывают прямое или косвенное влияние на процесс управления рисками. Информация, подлежащая обмену, определяется этапом QRM, критичностью и сроками реализации проекта.

Проверка риска(ов)

Результаты процесса управления рисками отслеживаются и пересматриваются через определенные промежутки времени и при внесении изменений в систему, поскольку QRM является непрерывной частью процесса управления качеством [3]. Несмотря на хорошо спланированный анализ риска(ов), который приводит к минимизации неизвестных опасностей и выявлению новых переменных, необходима периодическая проверка системы QRM. Анализ производительности, КПК, результатов CAPA и тенденций может выполняться как в упреждающем порядке, так и реактивно – в ответ на новые выводы, обнаруженные в ходе аудита, сбои или отзывы специалистов. Инструменты анализа рисков, такие как показатели производительности/ключевые показатели эффективности и бенчмаркинг (эталонное оценивание, benchmarking), дополняют инструменты измерений при анализе рисков. В то время как анализ производительности помогает в оценке успеха процесса QRM, бенчмаркинг



Рис. 2. Элементы процедуры корректирующих и предупреждающих действий (CAPA)

Fig. 2. Elements of corrective action and preventive action (CAPA)

Таблица 6. Факторы риска(ов) для различных критических показателей качества таблетированных лекарственных форм

Table 6. Risk factors for various critical quality attributes of tablet dosage forms

Объект анализа риска(ов) Risk analysis object	КПК и КПП, на которые влияют факторы риска(ов) CQAs and CPAs affected by risk factors	Факторы риска(ов) Risk factors
Фармацевтическая субстанция API	Растворимость, однородность содержания, стабильность, содержание примесей, идентификация Solubility, content uniformity, stability, impurity content, identification	Размер частиц, влажность, полиморфизм, растворимость, стабильность, остаточный растворитель, солевая форма Particle size, humidity, polymorphism, solubility, stability, residual solvent, salt form
Наполнитель Filler	Испытание «растворение», однородность дозирования, степень сыпучести Dissolution test, uniformity of dosing, degree of looseness	Марка, размер частиц, насыпная плотность Grade, particle size, bulk density
Дезинтегрант Disintegrant	Испытание «растворение», время распадаемости, твердость Dissolution test, disintegration time, hardness	Вид, количество ВВ Type, amount of excipients
Смазывающее ВВ Lubricating excipients	Испытание «растворение», внешний вид, прочность таблеток на раздавливание, на истираемость, совместимость компонентов Dissolution test, appearance, crushing strength of tablets, abrasion resistance, compatibility of components	Вид, количество ВВ Type, amount of excipients
Смешивание Mixing	Однородность дозирования, количественное определение Uniformity of dosing, quantification	Скорость разделителя, скорость вращения лопастей, усилие сдвига, размер частиц лекарственного средства, потеря в массе при высушивании Separator speed, blade rotation speed, shear force, API's particle size, weight loss during drying
Опудривание Lubrication	Испытание «растворение», время распадаемости, твердость, внешний вид Dissolution test, disintegration time, hardness, appearance	Количество смазывающего ВВ, скорость перемешивания, продолжительность операции Amount of lubricating excipients, mixing rate, duration of operation
Прессование Tablet compression	Испытание «растворение», время распадаемости, внешний вид, прочность таблеток, однородность дозирования Dissolution test, disintegration time, appearance, tablet strength, uniformity of dosing	Усилие прессования, скорость прессования, скорость подачи, гранулометрический состав Compaction force, compaction speed, feed speed, granulometric composition
Влажная грануляция Wet granulation	Размер частиц, гидролитическая деструкция, прочность гранул, степень сыпучести, прессуемость таблеток, время распадаемости, однородность дозирования, испытание «растворение», слипание частиц, разрушение верхнего слоя прессованной таблетки («capping») Particle size, hydrolytic degradation, granule strength, degree of looseness, tablet compressibility, disintegration time, uniformity of dosing, dissolution test, particle sticking, fracture of the top layer of the compressed tablet («capping»)	Выбор связующего, уровень связующего, скорость добавления воды, время добавления воды, скорость вращения крыльчатки, количество воздуха, скорость распыления, давление распыляющего воздуха и время сушки Binder selection, binder level, water addition rate, water addition time, impeller rotation speed, air amount, spray rate, spray air pressure and drying time
Сухая грануляция/брикетирование Dry granulation/roller compaction	Гранулометрический состав, прочность таблетки, растворение, однородность дозирования и т. д. Granulometric composition, tablet strength, dissolution, uniformity of dosing, etc.	Усилие валька, зазор между вальками, скорость валька, скорость и объем подачи, скорость винта, скорость смешивания, размер сита для гранулирования Rolling force, roll gap, roll speed, feed speed and volume, screw speed, mixing speed, granulation screen size
Процесс распылительной сушки Spray-drying process	Размер частиц, выход, влажность, количество «пылевой» фракции порошка, индекс прессуемости, коэффициент Хауснера, прессуемость и т. д. Particle size, yield, humidity, amount of powder dust fraction, compressibility index, Hausner coefficient, compressibility, etc.	Температура на входе, скорость подачи и скорость распыления, давление атомизации Inlet temperature, feed rate and spray rate, atomization pressure

Примечание. КПК – критические показатели качества; КПП – критические показатели процесса; ВВ – вспомогательные вещества.

Note. CQAs – critical quality attributes; CPAs – critical process attributes; API – active pharmaceutical ingredient.

сравнивает производительность процесса с эффективностью зарекомендовавшего себя процесса [26].

Анализ рисков постоянно выполняется в течение жизненного цикла ЛП. Результатом пересмотра может стать постоянное улучшение характеристик продукта и развитие процесса регулирования КПК.

Заключение

В руководящих документах ICH Q9 описаны основные инструменты для идентификации, анализа и оценки рисков, которые непосредственно связаны с задачами ЦПКП разрабатываемого ЛС. Среди методов анализа риска(ов) следует выделить РНА, FMEA/ФМЕСА, ФТА, НАССР, а также методы, которые применяются как вспомогательные, например диаграммы Парето, Ишикавы («рыбья кость»), имеющие достоинства и недостатки, связанные со специфичностью методов для определенных задач. Все перечисленные методы оценки риска(ов) дополняются инструментами САРА, RCA, DOE, математического планирования и моделирования и являются неотъемлемой частью проектного поля и системы фармацевтической разработки. Развитие этих инструментов, совершенствование подходов к рациональному планированию и анализу экспериментальных данных в сочетании с развитием анализа данных, в том числе больших массивов данных, способны

обеспечить не только сокращение затрат на фармацевтическую разработку, но и надежность фармацевтической системы качества и безопасность ЛС на протяжении всех этапов жизненного цикла ЛП. Ключевую роль в достижении поставленных целей играет оценка КПК фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ, полупродуктов, упаковочных материалов с установлением соответствующих спецификаций. Оценка КПП помогает определить меры управления и корректировки изменчивого процесса в рамках проектного поля.

Однако описанная в ICH Q9 система QRM имеет и ряд недостатков, например высокую зависимость от субъективных оценок специалистов, необъективность многих инструментов идентификации и анализа рисков (мозговой штурм, интервью). Данные недостатки частично исправляются такими приемами, как анонимная оценка в методе Дельфи или введение НПР для перевода качественных характеристик в количественные и понимания необходимости снижения тех или иных видов опасностей для КПК. Кроме того, упомянутые приемы показывают необходимость развития статистических, независимых от экспертов количественных методов оценки риска(ов) как для отдельной технологической операции или аппарата, так и всей технологической цепочки и фармацевтической разработки ЛП.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. ICH Q8. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Geneva, 2005. 19 p.
2. Food and Drug Administration CDER. Guidance for industry, Q8 (R2) pharmaceutical development. 2009. 25 p.
3. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q9: Quality Risk Management, ICH. Geneva, Switzerland, 2005. 20 p.
4. Quality risk management (ICH Q9). 2011. EMA/INS/GMP/79766/2011. Available at: <https://www.inspiredpharma.com/wp-content/uploads/2012/03/ich-9.pdf>.
5. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q10: Pharmaceutical Quality System. Geneva, 2011. 18 p.
6. AS/NZS ISO 31000. Risk management – Principles and guidelines. International Organization for Standardization. 2009. Available at: http://globaltraining.edu.au/global_training_institute/Resource_Library/Australian_Standards/AS_NZS_ISO_31000-2009_Risk_management_-_Principles_and_guidelines.pdf.
7. ГОСТ Р ИСО 31000–2019 Менеджмент риска. Принципы и руководство. М.: Стандартинформ, 2020. 14 с. Доступно по: <https://pqm-online.com/assets/files/lib/std/gost-r-iso-31000-2019.pdf>. ISO 31000:2019 Risk management. Principles and guidelines. Moscow: Standartinform, 2020. 14 p. (In Russ.). <https://pqm-online.com/assets/files/lib/std/gost-r-iso-31000-2019.pdf>.
8. Блынская Е.В., Тишков С.В., Алексеев К.В. и др. Особенности фармацевтической разработки лиофилизата ГК-2 для парентерального применения. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(4):81–90. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-81-90
Blynskaya E.V., Tishkov S.V., Alekseyev K.V. et al. Features pharmaceutical development lyophilisate GK-2 for parenteral use. Rossiiskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(4):81–90. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-81-90
9. O'Malley P. Consuming risks: harm minimization and the government of 'drug-users'. In: Governable places. Ed. by R. Smandych. Routledge, 2019. P. 191–214. DOI: 10.4324/9780429427114-8
10. Ferdosi M., Rezayatmand R., Molavi Taleghani Y. Risk management in executive levels of healthcare organizations: insights from a scoping review. Risk Manag Healthc Policy 2020; 13:215–43. DOI: 10.2147/RMHP.S231712
11. Cooper R.G. The drivers of success in new-product development. Industr Market Manag 2019;76:36–47. DOI: 10.1016/j.indmarman.2018.07.005
12. Okan S.Ü., Acar H.H., Gümüş S., Ergenç İ. Evaluation of the risks in wood harvesting activities by the preliminary hazard analysis (PHA). Ileri Teknoloji Bilimleri Dergisi 2019;8(2):66–73.
13. Subriadi A.P., Najwa N.F. The consistency analysis of failure mode and effect analysis (FMEA) in information technology risk assessment. Heliyon 2020;6(1):e03161. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e03161
14. Press D. Guidelines for failure modes and effects analysis for medical devices. CRC Press, 2018. 190 p.

15. Ruijters E., Stoelinga M. Fault tree analysis: a survey of the state-of-the-art in modeling, analysis and tools. *Computer Sci Rev* 2015;15:29–62. DOI: 10.1016/j.cosrev.2015.03.001
16. Signoret J.P., Leroy A. Hazard and operability study (HAZOP). In: *Reliability assessment of safety and production systems: analysis, modelling, calculations and case studies*. Springer, Cham, 2021. P. 157–164. DOI: 10.1007/978-3-030-64708-79
17. Gehring K.B., Kirkpatrick R. Hazard analysis and critical control points (HACCP). In: *Food safety engineering*. Ed. by A. Demirci, H. Feng, K. Krishnamurthy. Springer, Cham, 2020. P. 191–204. DOI: 10.1007/978-3-030-42660-6_8
18. Mazumder S., Pavurala N., Manda P. et al. Quality by Design approach for studying the impact of formulation and process variables on product quality of oral disintegrating films. *Int J Pharm* 2017;527(1–2):151–60. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.05.048
19. Jaberidoost M., Olfat L., Hosseini A. et al. Pharmaceutical supply chain risk assessment in Iran using analytic hierarchy process (AHP) and simple additive weighting (SAW) methods. *J Pharm Policy Pract* 2015;8(1):1–10. DOI: 10.1186/s40545-015-0029-3
20. Luciani F., Galluzzo S., Gaggioli A. et al. Implementing quality by design for biotech products: Are regulators on track? *MAbs* 2015;7(3):451–5. DOI: 10.1080/19420862.2015.1023058
21. Politis S.N., Colombo S., Colombo P., Rekkas D.M. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Dev Ind Pharm* 2017;43(6):889–901. DOI: 10.1080/03639045.2017.1291672
22. Rodríguez C., Ortiz I., Martínez I. Locally and maximin optimal designs for multi-factor nonlinear models. *Statistics* 2015;49(5):1157–68. DOI: 10.1080/02331888.2014.922562
23. Wichman K., Greenall J. Using root cause analysis to determine the system-based causes of error. *Canadian Farm J* 2006;139(3):63–5. DOI: 10.1177/171516350613900314
24. Peerally M.F., Carr S., Waring J., Dixon-Woods M. The problem with root cause analysis. *BMJ Qual Saf* 2017;26(5):417–22. DOI: 10.1136/bmjqs-2016-005511
25. Hussain T., Eskildsen J.K., Edgeman R. The intellectual structure of research in ISO 9000 standard series (1987–2015): a bibliometric analysis. *Total Qual Manag Business Excellence* 2020;31(11–12):1195–224. DOI: 10.1080/14783363.2018.1469977
26. ГОСТ ISO 14971–2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям. ISO 14971:2007 Medical devices – Application of risk management to medical devices. (In Russ.).

Вклад авторов

С.В. Тишков: получение материала исследования, написание текста статьи;
Е.В. Блынская: разработка дизайна исследования, обобщение материала исследования;
К.В. Алексеев: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных;
В.К. Алексеев: обзор публикаций по теме статьи, анализ материала.

Author's contributions:

S.V. Tishkov: obtaining research material, article writing;
E.V. Blynskaya: development of research design, generalization of research material;
K.V. Alekseev: development of research design, analysis of the data obtained;
V.K. Alekseev: review of publications on the topic of the article, analysis of the material.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.В. Тишков / S.V. Tishkov: <https://orcid.org/0000-0002-8321-6952>
Е.В. Блынская / E.V. Blynskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9494-1332>
К.В. Алексеев / K.V. Alekseev: <https://orcid.org/0000-0003-3506-9051>
В.К. Алексеев / V.K. Alekseev: <https://orcid.org/0000-0003-3542-0024>

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: 31.10.2022. Принята к публикации: 04.12.2022.

Article received: 31.10.2022. Accepted for publication: 04.12.2022.

Генетический профиль пациентов с немелкоклеточным раком легкого I–IIIА стадий

А. М. Казаков¹, К. К. Лактионов^{1,2}, К. А. Саранцева¹

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

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Алексей Михайлович Казаков kazakovich873@gmail.com

Введение. В статье представлены данные о соматических мутациях, встречающихся у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), их частоте, распределении в зависимости от гистологического типа опухоли.

Цель исследования – изучить молекулярно-генетический профиль пациентов с локализованным НМРЛ I–IIIА стадий, частоту встречаемости различных соматических мутаций, варианты комутационного статуса.

Материалы и методы. Проведено генетическое тестирование на панель из 78 генов при помощи метода NGS (next generation sequencing) опухолевого материала, полученного после оперативного лечения 65 пациентов с локализованным НМРЛ I–IIIА стадий. Обработка полученных данных осуществлялась с помощью методов описательной статистики.

Результаты. Мутации в генах *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *RET*, *BRAF*, *KRAS*, *MET*, *HER2* встречались только при аденокарциноме. Среди нетаргетных мутаций при аденокарциноме чаще всего встречались мутации *TP53*, *STK11*, *FGFR3*, *EML4*, *NF1*, *RB1*, *KMT2C*. При плоскоклеточном раке легкого чаще всего встречались мутации *TP53*, *KMT2C*, *TSC1*, *EML4*, *PTEN*, *NF1*, *COL22A1*, *CDKN2A*, *RB1*, *BRCA1*. Мутация в гене *EGFR* наиболее часто сочеталась с мутациями *TP53* (30 % случаев), *RB1* (15 % случаев), *COL22A1* (15 % случаев); мутация *ALK* сочеталась с мутациями *TP53*, *NF1*, *WT1* – по 33 % случаев; *ROS1* – с *DDR2* (33 % случаев); мутация *ERBB2* – с мутациями *NTRK1*, *GPC3*, *HIP1*, *KIF5B*, *TP53*, *XPC*, *COL22A1* – по 14 % случаев; мутация *BRAF* чаще всего ассоциировалась с мутациями в генах *TP53* (14 %) и *COL22A1* (13,8 %); мутация в гене *RET* ассоциировалась с мутацией *TP53*; транслокация *ROS1* в 50 % случаев ассоциировалась с мутациями в генах *TRIM33* и *TP53*.

Заключение. Полученные данные дают представление о частоте встречаемости соматических мутаций у пациентов с НМРЛ, что является важным результатом для подбора диагностических панелей, интерпретации их результатов и потенциально для выработки оригинальных кастомных панелей NGS-тестирования.

Ключевые слова: секвенирование нового поколения, соматические мутации, немелкоклеточный рак легкого

Для цитирования: Казаков А. М., Лактионов К. К., Саранцева К. А. Генетический профиль пациентов с немелкоклеточным раком легкого I–IIIА стадий. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(1):42–8. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-42-48

Genetic profile of patients with stage I–IIIА non-small cell lung cancer

Alexey M. Kazakov¹, Konstantin K. Laktionov^{1,2}, Ksenia A. Sarantseva¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 1154522, Russia;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia

Contacts: Alexey Mikhailovich Kazakov kazakovich873@gmail.com

Background. The article presents data on somatic mutations found in the Russian population of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), their frequency, distribution depending on the histological type of tumor.

Aim. To study the molecular genetic profile of Russian patients with stage I–IIIА localized NSCLC, the frequency of occurrence of various somatic mutations, variants of the switching status.

Materials and methods. Genetic testing for a panel of 78 genes using the Next Generation Sequencing method of tumor material obtained after surgical treatment of 65 patients with localized stage I–IIIА NSCLC. Processing of the received data was carried out by methods of descriptive statistics.

Results. Mutations in the *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *RET*, *BRAF*, *KRAS*, *MET*, *HER2* genes were found only in adenocarcinoma. Among non-targeted mutations in adenocarcinoma, *TP53*, *STK11*, *FGFR3*, *EML4*, *NF1*, *RB1*, and *KMT2C* mutations were the most common. In squamous cell lung cancer, *TP53*, *KMT2C*, *TSC1*, *EML4*, *PTEN*, *NF1*, *COL22A1*, *CDKN2A*, *RB1*, *BRCA1* were the most common. Mutations in the *EGFR* gene were most often associated with mutations in *TP53* (30 % of cases), *RB1* (15 % of cases), *COL22A1* (15 % of cases); *ALK* was combined with *TP53*, *NF1*, *WT1* – in 33 % of cases, *ROS1* with *DDR2* (33 % of cases), *ERBB2* was combined with *NTRK1*, *GPC3*, *HIP1*, *KIF5B*, *TP53*, *XPC*, *COL22A1* – in 14 % of cases, *BRAF* was most often associated with mutations in the *TP53* gene (14 %) and *COL22A1* (13.8 %); a mutation in the *RET* gene was associated with a *TP53* mutation; *ROS1* translocation in 50 % of cases was associated with mutations in the *TRIM33* and *TP53* genes.

Conclusion. The data obtained give an idea of the frequency of occurrence of somatic mutations among Russian patients with NSCLC, which is important for the selection of diagnostic panels, interpretation of their results, and also potentially for the development of original custom Next Generation Sequencing testing panels.

Keywords: next generation sequencing, somatic mutations, non-small cell lung cancer

For citation: Kazakov A.M., Laktionov K.K., Sarantseva K.A. Genetic profile of patients with stage I–IIIA non-small cell lung cancer. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(1):42–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-42-48

Введение

Рак легкого — одно из самых распространенных злокачественных заболеваний как в России, так и в других странах. Наибольшая доля первично выявленных случаев данного заболевания приходится на немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) — около 70–80 %, а 20 % составляют мелкоклеточный рак легкого и другие, более редкие подтипы [1]. При НМРЛ, особенно при аденокарциноме легкого, очень важной частью диагностики является определение генетического профиля опухоли, поскольку выявление некоторых соматических мутаций предполагает назначение очень эффективной таргетной терапии [2]. Как правило, генетическое тестирование проводится на наиболее часто встречающиеся мутации, для которых существует терапия, — *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF* (это обязательный объем генетического тестирования) [3]. Также генетическое тестирование может осуществляться и на более редкие варианты соматических мутаций — *RET*, *cMET*, *KRAS*, *HER2*. Достаточно долгое время таргетная терапия при НМРЛ применялась только при диссеминированных формах заболевания. Однако исследование ADAURA показало значительный выигрыш в безрецидивной выживаемости у *EGFR*-мутированных пациентов с локализованным НМРЛ после хирургического лечения при назначении ингибитора EGFR III поколения осимертиниба в адьювантном режиме по сравнению с плацебо. По окончании периода наблюдения в 24 мес 90 % пациентов в группе осимертиниба были живы и не имели признаков прогрессирования заболевания, тогда как аналогичный показатель в группе плацебо составил 44 % [4]. Это исследование продемонстрировало, что определение генетического статуса очень важно и у пациентов с локализованным НМРЛ. Однако мутации, для которых на данный момент существует таргетная терапия, составляют лишь очень малую часть всех соматических мутаций,

встречающихся при НМРЛ, как при аденокарциноме, так и при плоскоклеточном раке [5]. Их изучение также может внести большой вклад в улучшение диагностики и лечения НМРЛ, поскольку многие из них являются важными факторами прогноза заболевания, для некоторых в скором времени будут зарегистрированы таргетные препараты, а клиническое значение других только начинает изучаться. Активное внедрение и совершенствование методов секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) способствует укреплению тенденции к более углубленному изучению генетического профиля, поскольку делает возможным проведение одновременного и высокоточного тестирования опухолевого материала на широкие панели мутаций [6].

Цель исследования — изучить молекулярно-генетический профиль пациентов с локализованным НМРЛ I–IIIA стадий, частоту встречаемости различных соматических мутаций, варианты комутационного статуса.

В данной работе впервые в России изучены молекулярно-генетический профиль 65 пациентов с локализованным НМРЛ I–IIIA стадий, частота встречаемости обнаруженных соматических мутаций, варианты комутационного статуса (одновременное определение нескольких соматических мутаций у 1 пациента).

Материалы и методы

В проспективное исследование были включены 65 пациентов с локализованным НМРЛ I–IIIA стадий, получавших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с 2020 по 2021 г. Для генетического тестирования использовали послеоперационный опухолевый материал (FFPE-блоки, $n = 65$), который сравнивали с результатами генетического тестирования нормальной ткани легкого для выявления истинных соматических мутаций (исключения полиморфизмов). ДНК из

образцов ткани выделяли с помощью набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Польша). Генетическое тестирование проводили при помощи таргетного секвенирования методом NGS на панель из 78 генов: *KMT2C*, *STK11*, *KRAS*, *TP53*, *ALK*, *EML4*, *ITGA9*, *FGFR1,2,3*, *SYNE1*, *MLLT10*, *WT1*, *ATM*, *ERBB2,3*, *LTK*, *NF1*, *BRCA1,2*, *AKT1,2,3*, *CHEK2*, *KDM5C*, *TAF1*, *TRIM33*, *IKBKE*, *TCF7L1*, *LRP1B*, *PMS1*, *PIK3CB*, *PIK3CA*, *KIT*, *ADAMTS2*, *NOTCH4*, *ROS1*, *ETV1*, *ADGRA2*, *KAT6A*, *NBN*, *TSC1*, *RBI*, *CDH5*, *CDK12*, *CIC*, *DDR2*, *BRAF*, *PTEN*, *NTRK1,2,3*, *COL1A1*, *COL22A1*, *MPL*, *PTGS2*, *MSH2,6*, *PDGFRA*, *EGFR*, *GPC3*, *XPC*, *SLC34A2*, *NCOA4*, *HIP1*, *KIF5B*, *CDKN2A*, *NRAS*, *MET*, *FYCO1*, *NBPF20*, *PBX1*, *ABL2*, *RNF2*, *PARP1*, *GOPC*, *SLC39A8*, *RET*. Далее проводили биоинформатический анализ полученных данных – файлы FASTQ обрабатывали для удаления адаптеров, с 3'-конца удаляли все N и буквы с качеством <15 методом «скользящего окна» (размер окна – 6 нуклеотидов). Полностью удаляли все прочтения, содержащие более 40 % букв с качеством <15, и прочтения длиной <36. Затем выполняли картирование на геном с помощью алгоритма BWA-MEM и последующее удаление дубликатов. Проводили рекалибровку значений качества с помощью инструмента BaseRecalibrator, затем поиск вариантов с помощью алгоритмов DRAGEN, Strelka2 и HaplotypeCaller/Mutect2 из GATK4. Получившиеся VCF-файлы объединяли с удалением дублирующихся строк. Постобработка вариантов проводилась с помощью предобученной нейронной сети (CNNScoreVariants, модель 2D) и индивидуальных фильтров по качеству. Варианты аннотировались по следующим источникам данных: RefSeq, LRG/MANE, dbSNP, gnomAD, OMIM, ClinVar, HGMD (публичная), алгоритмы предсказания патогенности SIFT, PolyPhen HDIV/HVAR, Mutation Taster, FATHMM, CADD, DANN, M-CAP, REVEL, BayesDel, ClinPred, LIST-S2. Также выполняли рутинное гистологическое исследование для определения морфологического типа опухоли (иммуногистохимическое исследование при необходимости). Статистическая обработка материала и расчеты показателей проведены с использованием компьютерной программы – электронных таблиц Microsoft Excel.

Результаты

По данным морфологического исследования операционного материала исследуемая группа пациентов включала 25 (38,4 %) случаев плоскоклеточного рака легкого и 40 (61,6 %) случаев аденокарциномы легкого. Соотношение стадий заболевания, установленных по данным послеоперационного морфологического исследования, составило: IA1 – 1 (1,5 %), IA2 – 9 (13,8 %), IA3 – 5 (7,7 %), IB – 10 (15 %), IIA – 5 (7,7 %), IIB – 21 (32,3 %), IIIA – 14 (21,5 %) (рис. 1).

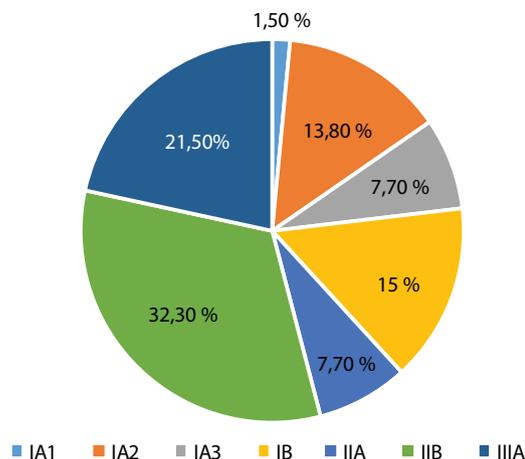


Рис. 1. Распределение пациентов в зависимости от стадии заболевания

Fig. 1. Distribution of patients depending on stages of disease

Из 78 соматических мутаций, представленных в используемой панели NGS, 75 генов было идентифицировано у исследуемой группы пациентов (мутаций в генах *AKT2,3* и *NBPF20* выявлено не было).

Данные о выявленных соматических мутациях методом NGS, а также о частоте встречаемости мутаций в исследуемой популяции представлены на рис. 2.

В табл. 1 мутации разделены на 3 группы в зависимости от частоты встречаемости при НМРЛ (обоих гистологических подтипов).

Далее представлены частоты встречаемости соматических мутаций при плоскоклеточном раке легкого (рис. 3, табл. 2) и аденокарциноме (рис. 4, табл. 3).

У 1 пациента в среднем было обнаружено 5 соматических мутаций. Если разделить пациентов по группам, основываясь на различных морфологических типах, то при аденокарциноме среднее количество мутаций у пациента составило 4,5, при плоскоклеточном раке легкого – 5, что говорит о практически одинаковом количестве соматических мутаций из изучаемой панели как при аденокарциноме, так и при плоскоклеточном раке легкого.

Только при аденокарциноме ожидаемо встречались мутации в генах *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *RET*, *BRAF*, *KRAS*, *MET*, *HER2*. Среди нетаргетных мутаций при аденокарциноме чаще всего встречались мутации *TP53*, *STK11*, *FGFR3*, *EML4*, *NF1*, *RBI*, *KMT2C*. При плоскоклеточном раке легкого чаще всего встречались мутации *TP53*, *KMT2C*, *TSC1*, *EML4*, *PTEN*, *NF1*, *COL22A1*, *CDKN2A*, *RBI*, *BRCA1*.

Наиболее клинически значимые соматические мутации, такие как *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *RET*, имели следующие комутации, встречающиеся одновременно с ними: мутация в гене *EGFR* наиболее часто сочеталась с мутациями *TP53* (30 % случаев), *RBI* (15 % случаев), *COL22A1* (15 % случаев); мутация *ALK*

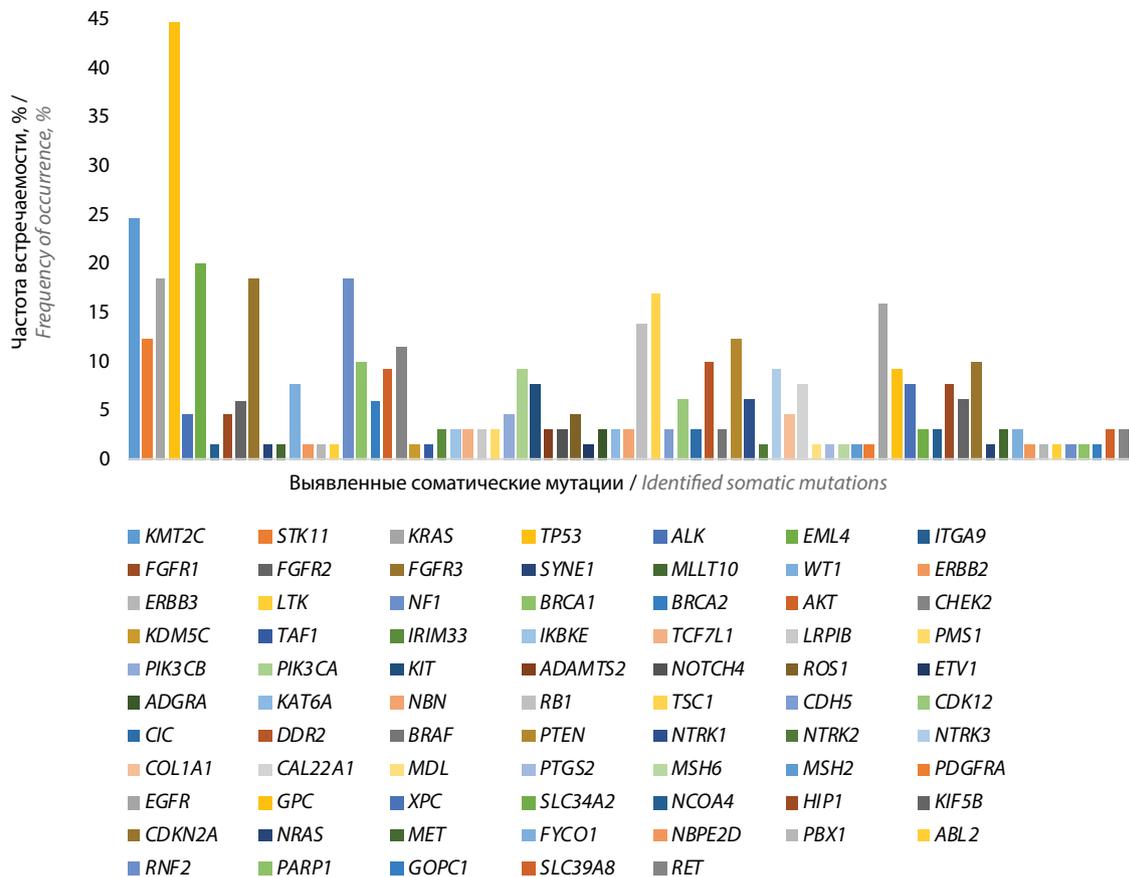


Рис. 2. Частота встречаемости соматических мутаций в исследуемой группе пациентов

Fig. 2. The frequency of occurrence of somatic mutations in the study group of patients

Таблица 1. Группировка мутаций по частоте встречаемости при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ)

Table 1. Grouping mutations by frequency of occurrence in non-small cell lung cancer (NSCLC)

Частота встречаемости мутаций при НМРЛ, % Mutation frequency in NSCLC, %	Соматические мутации Somatic mutations
1–5	ALK, ITGA9, FGFR1, SYNE1, MLLT10, CHEK2, ATM, ERBB3, LTK, KDM5C, TAF1, IRIM33, IKBKE, TCF7L1, LRP1B, PMS1, PIK3CB, ADAMTS2, NOTCH4, ROS1, ETV1, ADGRA, KAT6A, NBN, CDH5, CIC, NTRK2, COL1A1, MDL, PTGS2, MSH6, MSH2, PDGFRA, SLC34A2, NCOA4, NRAS, MET, FYCO1, NBPE2D, PBX1, ABL2, RNF2, PARP1, GOPC, SLC39A8, RET, BRAF
5,1–10	WT1, ERBB2, BRCA1, BRCA2, AKT, PIK3CA, KIT, CDK12, DDR2, NTRK1,3, COL22A1, GPC, SPC, HIP1, KIF5B, CDKN2A
>10	KMT2C, TP53, STK11, KRAS, EML4, FGFR3, NF1, TSC1, PTEN, EGFR

сочеталась с мутациями *TP53*, *NF1*, *WT1* – по 33 % случаев; *ROS1* – с *DDR2* (33 % случаев); мутация *ERBB2* сочеталась с мутациями *NTRK1*, *GPC3*, *HIP1*, *KIF5B*, *TP53*, *XPC*, *COL22A1* – по 14 % случаев; мутация *BRAF* чаще всего ассоциировалась с мутациями в генах *TP53* (14 %) и *COL22A1* (13,8 %); мутация в гене *RET* ассоциировалась с мутацией в экзоне 8 гена *TP53*; транслокация *ROS1* в 50 % случаев ассоциировалась с мутациями в генах *TRIM33* и *TP53*.

Обсуждение

При сравнении полученных данных о частоте соматических мутаций в исследуемой группе пациентов с общемировыми данными было выявлено, что частота встречаемости основных клинически значимых мутаций в генах *EGFR* (16 % в данном исследовании против 12,8 % по общемировым данным), *ALK* (соответственно 4,6 % против ~5 %), *ROS1* (соответственно 4,6 % против 2–3 %), *BRAF* (соответственно 3 % против 1–5 %) в целом соответствовала общемировым данным [7–9]. Анализ наиболее частых соматических мутаций, выявленных в данном исследовании, показал следующие результаты. Мутации в гене *TP53* в нашем исследовании были обнаружены

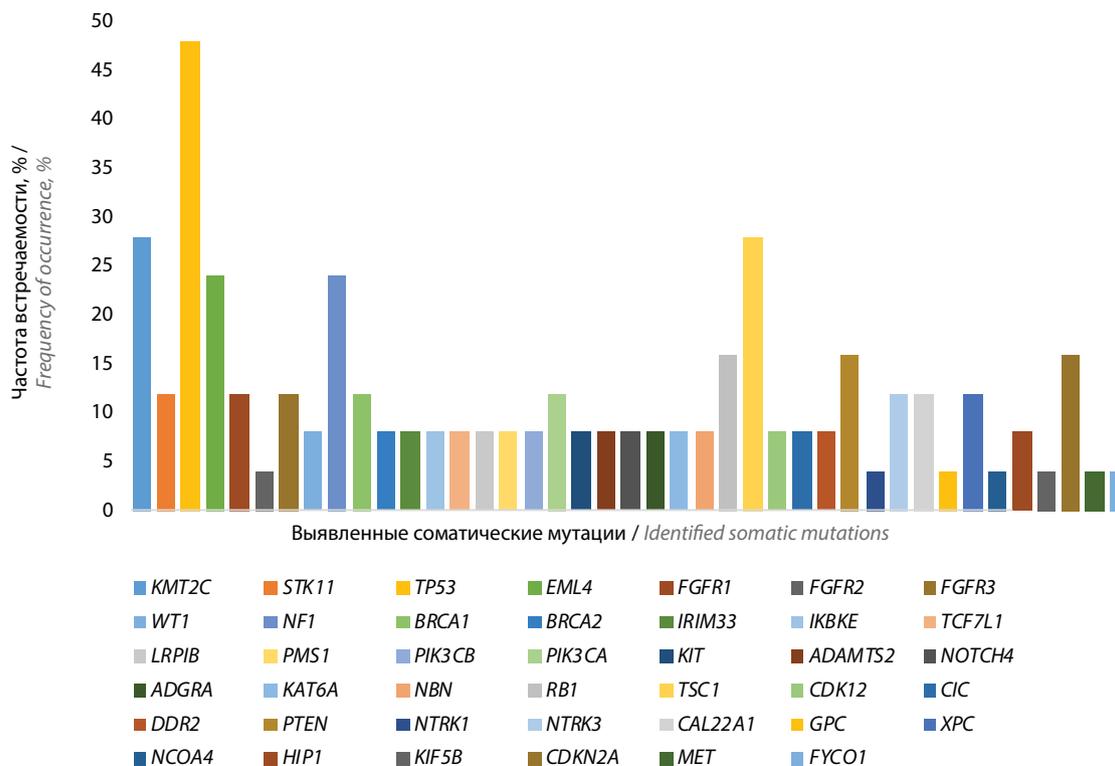


Рис. 3. Частота встречаемости соматических мутаций в исследуемой группе пациентов при плоскоклеточном раке легкого

Fig. 3. The frequency of occurring mutations in squamous cell lung cancer

Таблица 2. Группировка мутаций по частоте встречаемости при плоскоклеточном раке легкого

Table 2. Grouping mutations by frequency of occurrence in squamous cell lung cancer

Частота встречаемости мутаций при плоскоклеточном раке легкого, % Mutation frequency in squamous cell lung cancer, %	Соматические мутации Somatic mutations
1–10	FGFR2, WT1, IRIM33, BRCA2, IKBKE, TCF7L1, LRPIB, PMS1, PIK3CB, KIT, ADAMTS2, NOTCH4, ADGRA, KAT6A, NBN, CDK12, CIC, DDR2, NTRK1, GPC, NCOA4, HIP1, KIF5B, MET, FYCO1
>10	KMT2C, STK11, TP53, EML4, FGFR1,3, NF1, BRCA1, PIK3CA, RB1, TSC1, PTEN, NTRK3, CAL22A1, XPC, CDKN2A

в 45 % случаев, что полностью соответствует общемировым данным – ~50 % случаев НМРЛ [10]. Мутации в генах *KMT2C* и *NF1* в данной работе встречались в 24 и 18,4 % случаев соответственно, эти показатели значительно выше, чем представленные, например, в базе данных My Cancer Genome – 13,7

и 6,13 % соответственно. Напротив, мутации в гене *KRAS* в настоящем исследовании встретились в 18,4 % случаев, тогда как по мировым данным частота их встречаемости – 20–40 % [11]. Мутация в гене *STK11* в исследуемой группе пациентов встречалась практически с той же частотой, что и в Европейской и Американской популяциях пациентов с НМРЛ – 12,3 % против ~11 % (США и Европа) [12]. Мутация в гене *TSC1* также встречалась чаще, чем в Европейской популяции пациентов – 16,9 % против 2–7 % [13]. Мутации в гене *PTEN* в нашей работе обнаружены в 8,9 % случаев против 3,33 % по мировым данным, мутации в гене *FGFR3* – в 18,6 % случаев против 1,11 % согласно мировым данным (My Cancer Genome). Сравнить частоту встречаемости соматических мутаций в гене *EML4*, выявленную в настоящем исследовании, с общемировыми данными не представляется возможным ввиду отсутствия соответствующей информации в мировой литературе. По результатам сравнения полученных данных по наиболее частым соматическим мутациям можно отметить, что исследуемая группа пациентов имела как схожую с общемировыми показателями частоту встречаемости некоторых соматических мутаций (*TP53*, *STK11*), так и отличающуюся от них в большую (*KMT2C*, *NF1*, *TSC1*, *PTEN*, *FGFR3*) или меньшую сторону (*KRAS*). Частоту более редких мутаций, выявленных в данной

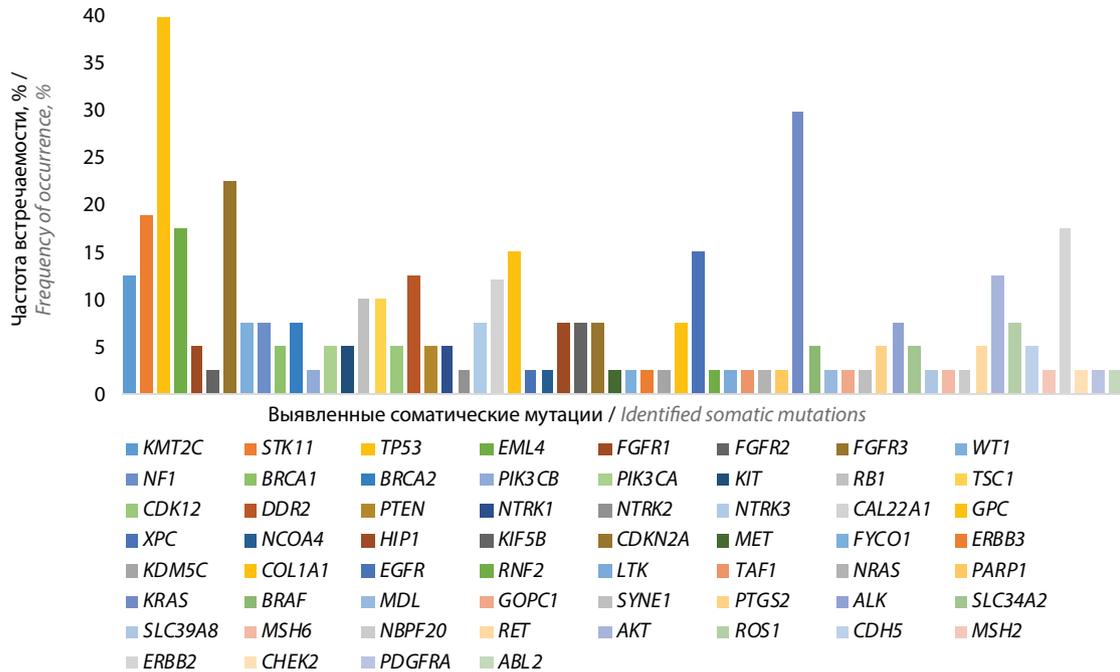


Рис. 4. Частота встречаемости соматических мутаций в исследуемой группе пациентов при аденокарциноме

Fig. 4. The frequency of occurrence of somatic mutations in the study group of patients with adenocarcinoma

Таблица 3. Группировка мутаций по частоте встречаемости при аденокарциноме легкого

Table 3. Grouping of mutations by frequency of occurrence in lung adenocarcinoma

Частота встречаемости мутаций при аденокарциноме, % Mutation frequency in adenocarcinoma, %	Соматические мутации Somatic mutations
0,1–5	FGFR1, BRCA1, PIK3CB, PIK3CA, KIT, CDK12, PTEN, NTRK1,2, XPC, NCOA4, MET, FYCO1, ERBB3, KDM5C, RNF2, LTK, TAF1, NRAS, PARP1, BRAF, MDL, GOPC1, SYNE1, MSH2,6, NBP20, BRAF, PDGFRA, ABL2, RET, PTGS2
>5	KMT2C, STK11, EML4, TP53, FGFR3, WT1, NF1, BRCA2, RB1, DDR2, NTRK3, GPC, CAL22A1, HIP1, KIF5B, CDKN2A, COL1A1, EGFR, KRAS, ALK, AKT, ROS1, ERBB2

работе (1–5 % и 5,1–10 %), сложно достоверно сравнить с мировыми данными в связи с их менее частой встречаемостью и малым количеством информации об их частоте в зарубежной литературе.

Заключение

Полученные данные показывают реальное распределение соматических мутаций в исследуемой группе пациентов с локализованным НМРЛ. Это дает представление о частоте их встречаемости в общей популяции и при отдельных гистологических подтипах НМРЛ, что является важным для подбора диагностических панелей, интерпретации их результатов, а также потенциально для выработки оригинальных кастомных панелей NGS-тестирования.

В перспективе углубленные знания о частоте встречаемости более редких соматических мутаций при локализованном НМРЛ и их связи с клинико-морфологическими параметрами опухоли и прогнозом заболевания позволят улучшить его диагностику, прогнозирование и сделать послеоперационное ведение пациентов с НМРЛ более прецизионным.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. 252 с.
Malignant neoplasms in Russia in 2021 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, A.O. Shakhzadova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMITs radiologii” Minzdrava Rossii, 2021. 252 p. (In Russ.).
2. Noor Z.S., Cummings A.L., Johnson M.M. et al. Targeted therapy for non-small cell lung cancer. *Semin Respir Crit Care Med* 2020;41(3):409–34. DOI: 10.1055/s-0039-1700994
3. Лактионов К.К., Артамонова Е.В., Бредер В.В. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению немелкоклеточного рака легкого. Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO 2022;12:41–59. DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-02
Laktionov K.K., Artamonova E.V., Breder V.V. et al. Practical recommendations for the drug treatment of non-small cell lung cancer. *Zlokachestvennyye opukholi: Prakticheskie rekomendatsii RUSSCO = Malignant tumors: RUSSCO Practical Guidelines 2022*;12:41–59. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-02
4. Wu Y.-L., Tsuboi M., He J. et al. Osimertinib in resected *EGFR*-mutated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2020;383(18):1711–23. DOI: 10.1056/NEJMoa2027071
5. Chu Q.S. Targeting non-small cell lung cancer: driver mutation beyond epidermal growth factor mutation and anaplastic lymphoma kinase fusion. *Ther Adv Med Oncol* 2020;12:1758835919895756. DOI: 10.1177/1758835919895756
6. Vnencak-Jones C., Berger M., Pao W. Types of molecular tumor testing. *My Cancer Genome* 2016. Available at: <https://www.mycancergenome.org/content/molecular-medicine/types-of-molecular-tumor-testing>
7. Melosky B., Kambartel K., Häntschel M. et al. Worldwide prevalence of epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Mol Diagn Ther* 2022;26(1):7–18. DOI: 10.1007/s40291-021-00563-1
8. Jazieh A.R., Gaafar R., Errihani H. et al. Real-world data on the prevalence of anaplastic lymphoma kinase-positive non-small-cell lung cancer in the Middle East and North Africa. *JCO Glob Oncol* 2021;7:1556–63. DOI: 10.1200/GO.21.00067
9. O’Leary C.G., Andelkovic V., Ladwa R. et al. Targeting BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2019;8(6):1119–24. DOI: 10.21037/tlcr.2019.10.22
10. Liu S., Yu J., Zhang H., Liu J. TP53 co-mutations in advanced *EGFR*-mutated non-small cell lung cancer: prognosis and therapeutic strategy for cancer therapy. *Front Oncol* 2022;12:860563. DOI: 10.3389/fonc.2022.860563
11. Adderley H., Blackhall F.H., Lindsay C.R. KRAS-mutant non-small cell lung cancer: converging small molecules and immune checkpoint inhibition. *EBioMedicine* 2019;41:711–16. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.02.049
12. Shire N.J., Klein A.B., Golozar A. et al. *STK11* (LKB1) mutations in metastatic NSCLC: prognostic value in the real world. *PLoS One* 2020;15(9):e0238358. DOI: 10.1371/journal.pone.0238358
13. Huang Q., Li F., Hu H. et al. Loss of *TSC1/TSC2* sensitizes immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer. *Sci Adv* 2022;8(5):eabi9533. DOI: 10.1126/sciadv.abi9533

Вклад авторов

А.М. Казаков: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста статьи;
К.К. Лактионов: проверка результатов, редактирование статьи;
К.А. Саранцева: обзор публикаций по теме статьи.

Authors’ contributions

A.M. Kazakov: study design development, data acquisition for analysis, data analysis, article writing;
K.K. Laktionov: checking the results, editing the article;
K.A. Sarantseva: a review of publications on the topic of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.М. Казаков / A.M. Kazakov: <https://orcid.org/0000-0002-9534-2729>
К.К. Лактионов / K.K. Laktionov: <https://orcid.org/0000-0003-4469-502X>
К.А. Саранцева / K.A. Sarantseva: <https://orcid.org/0000-0002-7817-8429>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 09.01.2023. Принята к публикации: 20.02.2023.

Article received: 09.01.2023. Accepted for publication: 20.02.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-1-49-61>

Взаимосвязь лимфоидных популяций (инфильтрации) первичной опухоли с иммунными реакциями в костном мозге у больных раком молочной железы

С.В. Чулкова^{1,2}, Е.Н. Шолохова¹, И.В. Поддубная³, И.С. Стилиди^{1,2}, А.В. Егорова²,
Н.А. Козлов¹, Н.Н. Тупицын¹

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

²ФГАУ ВО «Российский национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1а;

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

Контакты: Светлана Васильевна Чулкова chulkova@mail.ru

Введение. На сегодняшний день иммунотерапия прочно входит в стандарты лечения рака. Базисом для назначения иммунотерапии являются иммунологические маркеры опухоли, в том числе лимфоидная инфильтрация, изучению которой в последнее десятилетие уделяется все большее внимание. Несомненный интерес представляет исследование лимфоидной инфильтрации не только в зависимости от морфо-клинических показателей рака молочной железы (РМЖ), но и иммунной системы костного мозга.

Цель исследования – оценить инфильтрацию первичной опухоли лимфоцитами в зависимости от морфо-клинических характеристик РМЖ и иммунных реакций в костном мозге.

Материалы и методы. В исследование включены 125 больных РМЖ, которые получали лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Преобладали больные с РМЖ II стадии, умеренной дифференцировки (G₂). Люминальный подтип РМЖ составил 67 %, нелюминальный – 33 %. Выполнено иммунофенотипирование первичной опухоли (криостатные срезы). Использовали люминесцентный микроскоп ZEISS Axio-scope (Zeiss AG, Германия). Оценены CD45⁺, CD38⁺, T- и B-клеточная инфильтрация. Костный мозг: изучены CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD16⁺, CD56⁺-популяции. В работе использовали проточный цитометр FACSCanto II (США), программу Kaluza Analysis v2.1 (Beckman Coulter, США).

Результаты. CD45⁺-инфильтрация отмечена в 50,5 % случаев (30 % – выраженная, 26,4 % – умеренная). CD8⁺-клетки в 21,4 % случаев выразительно инфильтрировали опухоль. В 40 % случаев установлена CD38⁺-инфильтрация. При нелюминальном РМЖ выраженная CD45-инфильтрация отмечалась чаще, чем при люминальном (33 и 26 % соответственно). CD38⁺-инфильтрация выражена при нелюминальном РМЖ ($p = 0,016$). Инфильтрация CD45⁺ положительно коррелировала с ранними стадиями заболевания ($p = 0,071$) и была более выражена при инфильтративно-протоковом, чем при дольковом РМЖ: 59,2 и 20 % соответственно ($p = 0,05$). В костном мозге доля CD45RO⁺-клеток при люминальном РМЖ была больше, чем при нелюминальном: $37,3 \pm 2,3$ и $28 \pm 2,8$ % соответственно, $p = 0,04$. Напротив, доля CD19⁺CD38⁺-клеток была меньше: $24,2 \pm 2$ и $34,8 \pm 6$ %, $p = 0,041$. Интра- и интра-туморальные лимфоциты достоверно отрицательно коррелировали с костномозговыми лимфоидными популяциями: CD38⁺-клетки – с NK-клетками; CD4⁺-клетки – с В-предшественниками; CD8⁺-клетки – с В1-лимфоцитами.

Заключение. Лимфоидная инфильтрация РМЖ имеет связь со стадией, размером опухоли, гистологическим видом, биологическим подтипом. Интра-туморальные популяции CD38⁺, CD4⁺, CD3⁺, CD8⁺-клеток находятся в отрицательной корреляционной связи с лимфоидными популяциями костного мозга.

Ключевые слова: рак молочной железы, иммунофенотипирование, иммунофлюоресценция, криостатные срезы, костный мозг, лимфоидная инфильтрация, костномозговые лимфоциты

Для цитирования: Чулкова С.В., Шолохова Е.Н., Поддубная И.В. и др. Взаимосвязь лимфоидных популяций (инфильтрации) первичной опухоли с иммунными реакциями в костном мозге у больных раком молочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(1):49–61. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-49-61

The relationship of lymphoid populations (infiltration) of the primary tumor with bone marrow immune responses in patients with breast cancer

Svetlana V. Chulkova^{1,2}, Elena N. Sholokhova¹, Irina V. Poddubnaya³, Ivan S. Styldi^{1,2}, Angelina V. Egorova², Nikolay A. Kozlov¹, Nikolai N. Tupitsyn¹

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

²Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1a Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia;

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

Contacts: Svetlana Vasilievna Chulkova chulkova@mail.ru

Background. Currently, immunotherapy is firmly established in the standard of cancer treatment. The basis for the appointment of immunotherapy are immunological tumor markers, which include lymphoid infiltration, a detailed study of which has received increasing attention in the last decade. An undoubted interest is the study of lymphoid infiltration, not only depending on the morpho-clinical parameters of breast cancer (BC), but also on the immune system of the bone marrow.

Aim. To evaluate the infiltration of the primary tumor by lymphocytes depending on the morpho-clinical characteristics of BC and immune responses in the bone marrow.

Materials and methods. This study included 125 patients with BC who received treatment at the “N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Health of Russia. Tumor stage II was prevailed, a moderate degree of differentiation (G₂) was more often noted. The luminal BC – 67 %, non-luminal – 33 %. Immunophenotyping of the primary tumor: cryostat sections, ZEISS Axioscope luminescent microscope (Zeiss AG, Germany). CD45⁺, CD38⁺, T- and B-cell infiltration were assessed. Bone marrow: CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD16⁺, CD56⁺ lymphocytes and their subpopulations were studied (FACSCanto II flow cytometer, Kaluza Analysis v2.1 program (Beckman Coulter, USA)).

Results. CD45⁺ infiltration was noted in 50.5 % of cases (severe in 30 %, moderate – 26.4 %). CD8⁺ cells significantly infiltrated the tumor in 21.4 % of cases. CD38⁺ infiltration was observed in 40 %. In the non-luminal BC, severe CD45 infiltration was observed more frequently than in the luminal (33 % vs 26 %). CD38⁺ infiltration is expressed in non-luminal BC ($p = 0.016$). CD45⁺ infiltration was positively correlated with earlier stages ($p = 0.071$) more pronounced in infiltrative ductal BC, than in lobular BC: 59.2 % vs 20 % ($p = 0.05$). The content of CD45RO⁺ cells in bone marrow in the luminal BC is higher than in the non-luminal: 37.3 ± 2.3 % vs 28 ± 2.8 % ($p = 0.04$). The number of CD19⁺CD38⁺ cells, on the contrary, is less: 24.2 ± 2 % vs 34.8 ± 6 % ($p = 0.041$). Tumor-infiltrating lymphocytes highly correlated with bone marrow lymphoid populations: CD38⁺ cells with NK-bone marrow cells; CD4⁺ cells with the B-precursors; CD8⁺ cells with the B1-lymphocytes.

Conclusion. Lymphoid infiltration of BC is associated with stage, tumor size, histological type and biological subtype. Intratumoral populations CD38⁺, CD4⁺, CD3⁺, CD8⁺ cells are in a negative correlation with bone marrow lymphoid populations.

Keywords: breast cancer, immunophenotyping, immunofluorescence, cryostat sections, bone marrow, lymphoid infiltration, bone marrow lymphocytes

For citation: Chulkova S.V., Sholokhova E.N., Poddubnaya I.V. et al. The relationship of lymphoid populations (infiltration) of the primary tumor with bone marrow immune responses in patients with breast cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2023;22(1):49–61. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-49-61

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является одной из самых распространенных онкопатологий у женщин во всем мире. Заболеваемость РМЖ остается высокой [1]. Показатели смертности от РМЖ за последние годы снизились [2]. Это обусловлено как ранней диагностикой, так и совершенствованием подходов к лекарственной терапии. Вместе с тем лечение РМЖ остается сложной задачей, и еще многие вопросы ждут своего ответа. Хорошо известно, что большинство злокачественных опухолей явля-

ются довольно гетерогенными, что определяет их клиническое течение и выбор персональных лечебных подходов [3–5]. Гетерогенность опухолей обусловлена многими параметрами, включая экспрессию различных онкогенов, разнообразных маркеров клетками первичной и метастатической опухоли – стволовых и адгезионных факторов, рецепторов роста и стероидных гормонов, и др. [6–9]. Наравне с этим важное значение при раке имеет локальный иммунный ответ, изучение которого продолжается по сей день [10].

Фундаментальные исследования в области иммунологии рака в последние десятилетия позволили прояснить ряд механизмов в системе опухоль–иммунитет, благодаря чему стало возможным применение иммуностимулирующих препаратов. Следует отметить, что РМЖ сравнительно долго считался неиммунным по своей природе. Однако на сегодняшний день иммунологические параметры при РМЖ изучаются довольно широко. Инфильтрация опухоли мононуклеарными клетками, а именно лимфоцитами и макрофагами, является, пожалуй, одним из ведущих аспектов, обсуждаемых мировым научным сообществом, поскольку состояние иммунных реакций в значительной степени определяет динамику развития опухоли. Противоопухолевая иммунореактивность складывается из различных клеточных и гуморальных факторов. Клетки как врожденного, так и приобретенного иммунитета, созревание и обучение которых проходит в центральных и периферических лимфоидных органах, участвуют в противоопухолевых иммунных реакциях [11–13]. В совокупности клеточные и гуморальные факторы могут способствовать противоопухолевой защите, с одной стороны, и сдерживать или вовсе подавлять ее, с другой [14]. По данным разных источников, выраженная лимфоидная инфильтрация при РМЖ варьирует от 50 до 70 % [15–17]. Инфильтрирующие опухоль клетки экспрессируют широкий набор Т-, В-, миеломоноцитарных антигенов. Степень выраженности инфильтрации может определяться стадией рака и экспрессией различных рецепторных детерминант [15, 18]. Также отмечено, что интратуморальные иммунные реакции могут быть связаны с эффективностью лекарственного лечения [19, 20]. Например, это соотносится с Т-клеточной реакцией и уровнем активации Т-лимфоцитов, что показано в работе А.В. Субботиной и соавт. [21]. Эти работы и многие другие исследования указывают, что при РМЖ важное значение имеет направленность иммунных реакций [22]. Поэтому немалая доля научных изысканий посвящена изучению роли субпопуляций Т-, В-лимфоцитов в реализации противоопухолевого иммунного ответа. Так, характер интратуморальных иммунных реакций может быть связан с фенотипом опухоли: HLA-DR-негативные опухоли характеризовались сниженным содержанием Т-лимфоцитов (CD3⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺) [23, 24].

Важным аспектом в изучении взаимодействия опухоли и иммунной системы становятся исследования субпопуляций лимфоцитов в костном мозге, который является не только центральным, но и периферическим лимфоидным органом. Публикаций на этот счет пока немного, но их результаты свидетельствуют о важной роли как основных, так и малых субпопуляций Т-, В-клеток, естественных киллеров

костного мозга в реализации противоопухолевого иммунитета [25, 26]. В ряде работ показано, что в костном мозге увеличено содержание эффекторов противоопухолевого иммунитета, и это, в свою очередь, связано с распространенностью опухоли и ее клинико-морфологическими характеристиками [27–29].

Изучение интратуморальных реакций при РМЖ во взаимосвязи с лимфоидными популяциями костного мозга ранее не проводилось.

Цель данного исследования – изучить интратуморальную инфильтрацию при РМЖ и оценить взаимосвязь между субпопуляциями лимфоцитов костного мозга и первичной опухоли.

Материалы и методы

Материалом для данного исследования послужили образцы опухолевой ткани больных РМЖ. Всего включено в работу 125 больных РМЖ, которые обследованы и получили лечение в условиях ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Возраст больных варьировал от 29 до 79 лет, средний возраст составил $54,4 \pm 0,9$ года. Диагноз РМЖ установлен на основании клинических, рентгенологических и морфологических данных. Всем пациенткам выполнено хирургическое лечение: в объеме мастэктомии – 38 % ($n = 48$), радикальной резекции молочной железы – 62 % ($n = 77$). Все больные получили лекарственную терапию в адъювантном режиме. Лучевая терапия проведена в 36 % случаев ($n = 46$), гормонотерапия – в 72 % ($n = 92$).

Распространенность опухолевого процесса оценивали согласно клинической классификации и международной системе TNM (7-е издание). Распределение больных по стадиям было следующим: I стадия – 27,2 % случаев, IIА стадия – 32,8 %, IIВ стадия – 28,8 %, IIIА – 7,2 %, IIIВ – 1,6 %, IIIС – 2,4 % (табл. 1).

Таблица 1. Распределение больных в зависимости от стадии рака молочной железы

Table 1. Distribution of patients depending on the stage of breast cancer

Стадия Stage	<i>n</i>	%
I	34	27,2
IIА	41	32,8
IIВ	36	28,8
IIIА	9	7,2
IIIВ	2	1,6
IIIС	3	2,4
<i>Всего</i> <i>Total</i>	125	100,0

В большинстве случаев размер первичной опухоли соответствовал категории T2 (52,8 %, $n = 67$) и T1 (44,1 %, $n = 56$), в равном числе случаев выявлены стадии T4 и T3 (по 1,6 %, $n = 2$). Метастатическое поражение лимфоузлов (N+) наблюдалось в 50 % случаев ($n = 64$): N1 – в 39,4 % ($n = 50$), N2 – в 6,3 % ($n = 8$), N3 – в 4,7 % ($n = 6$). Чаще всего степень дифференцировки опухоли соответствовала G₂ (79,5 %, $n = 101$).

В соответствии с данными патоморфологического исследования в большинстве случаев диагностирован инфильтративно-протоковый РМЖ – 71 % ($n = 89$); инфильтративно-дольковый рак выявлен в 14 % случаев ($n = 17$), другие виды – в 15 % ($n = 19$).

Ввиду ретроспективного характера анализа разделение на молекулярно-биологические подтипы РМЖ нами выполнено на основании экспрессии рецепторов к эстрогенам. Опухоли, экспрессирующие рецепторы к эстрогенам, классифицировали как люминальный РМЖ. При отсутствии экспрессии таковых опухоли относили, соответственно, к нелюминальному подтипу. Таким образом, РМЖ в 67 % случаев ($n = 86$) классифицирован как люминальный, а в 33 % случаев ($n = 41$) – как нелюминальный подтип.

Имунофенотипирование лимфоидных популяций опухоли и костного мозга выполнено в лаборатории иммунологии гемопоэза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России методом иммунофлуоресценции.

Исследование лимфоидных популяций на криостатных срезах опухоли. После приготовления криостатных срезов опухоли их фиксировали на предметных стеклах ацетоном: 10 мин при температуре 4 °С. После фиксации срезы отмывали в среде 199 (рН 7,2–7,4), наносили моноклональные антитела и инкубировали в течение 30 мин. После отмывания наносили FITC-меченные F(ab²) – фрагменты антивидовых IgG1. По окончании инкубации препараты отмывали и консервировали 50 % раствором глицерина. Учет реакции выполняли на люминесцентном микроскопе ZEISS Axioscope (Zeiss AG, Германия). Оценена общелейкоцитарная (CD45), плазмоцитарная (CD38), Т-клеточная (CD3, CD4, CD8) и В-клеточная (CD20) инфильтрация. Моноклональные антитела представлены в табл. 2. Положительными считали клетки, имеющие мембранное свечение разной степени интенсивности (от слабой до выраженной). Выделяли 3 типа реакции:

- 1) практически полное отсутствие лимфоидной инфильтрации, слабая инфильтрация – антигенположительные клетки в срезе не определяются или определяется небольшое их количество в препарате;
- 2) умеренная инфильтрация – умеренное количество антигенположительных клеток в срезе, расположенных разрозненно или отдельными группами;
- 3) выраженная инфильтрация – скопления (очаги) антигенположительных клеток в срезе, могут встречаться крупные группы и инфильтраты из этих клеток.

Таблица 2. Панель моноклональных антител для иммунофенотипирования лимфоцитов и клеток опухоли

Table 2. Monoclonal antibodies for immunophenotyping of lymphocytes and tumor cells

Антитело Antibody	Клон Clone	Флуоресцентная метка Fluorescent label	Производитель Manufacturer
KL-1	–	–	Immunotech, Marseille, Франция Immunotech, Marseille, France
CD45	HI30	–	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD38	HIТ2	–	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD3	UCHT1	–	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD4	4B12	–	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD8	HIТ8a	–	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD20	2H7	–	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
F(ab ₂) – фрагменты F(ab ₂) – fragments	M1-14D12	FITC	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA

Имунофенотипирование лимфоцитов костного мозга. Имунофенотипирование лимфоцитов костного мозга выполнялось с использованием моноклональных антител, меченных напрямую флюорохромами (табл. 3). Костный мозг для исследования был получен при стерильной пункции. После выделения клеток костного мозга клеточную суспензию вносили в пробирки, добавляли антитела и инкубировали в течение 30 мин. Отмывали буферным раствором дважды. Сбор клеток и запись соответствующих файлов проводили на проточном цитометре FACSCanto II (США). Для каждой пробы собирали не менее 100 тыс. событий. Изучены CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, CD19⁺-, CD16⁺-, CD56⁺-лимфоциты и их субпопуляции. Оценку экспрессии антигенов выполняли с помощью программы Kaluza Analysis v2.1 (Beckman

Coulter, США). Пример цитометрического анализа лимфоцитов костного мозга представлен на рис. 1. Анализ проводился в гейте зрелых лимфоцитов на основании выраженной экспрессии CD45 в сочетании с низкими характеристиками бокового светорассеяния (SSC).

Статистическую обработку данных выполняли с использованием пакета IBM-SPSS Statistics v. 21. Осуществляли анализ корреляции по Пирсону или Спирмену, подсчет распределения частот по категориям с непрерывными и дискретными переменными (критерий Фишера и χ^2 по Пирсону). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Выполнена оценка выраженности общелейкоцитарной инфильтрации на основании количества

Таблица 3. Моноклональные антитела, использованные при иммунофенотипировании лимфоцитов костного мозга

Table 3. Monoclonal antibodies used in immunophenotyping of bone marrow lymphocytes

Антитело Antibody	Клон Clone	Флуоресцентная метка Fluorescent label	Производитель Manufacturer
CD45	HI30	V500-A, V450, PerCP	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD3	UCHT1	APC	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD4	RPA-T4	V450	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD8	HIT8a	APC-H7	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD19	H1B19	FITC, PE	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD20	2H7	APC-H7	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD16	CB16	FITC, PE	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD56	NCAM16.2	PerCP	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD25	M-A251	V450	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD10	HI10a	FITC	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD38	HIT2	PerCP	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD45RO	UCHL1	V450	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
CD5	UCHT2	FITC	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA
HLA-DR	G46-6	FITC, PE	Becton Dickinson, США Becton Dickinson, USA

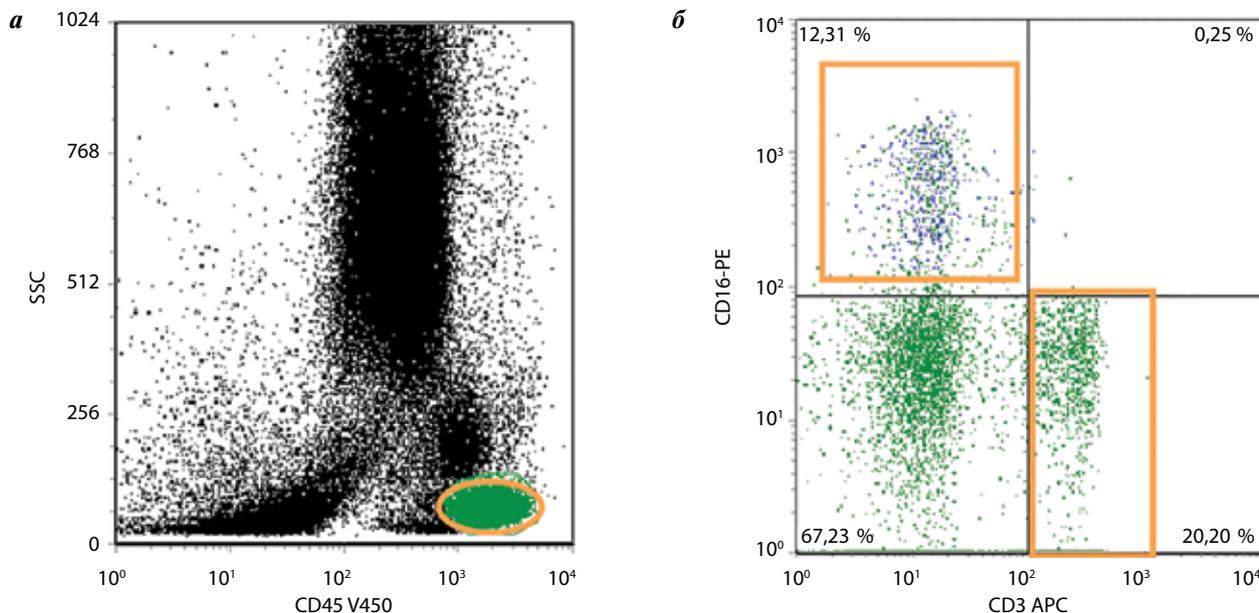


Рис. 1. Пример цитометрического анализа лимфоидных популяций в костном мозге: а – в координатах CD45/SSC выделен гейт лимфоцитов ($CD45^+$) (зеленый цвет); б – в гейте лимфоцитов в координатах CD16/CD3 NK-клетки ($CD16^+CD3^-$) составляют 12,3 % (синий цвет), CD3-клетки – 20,2 % (зеленый цвет)

Fig. 1. An example of a cytometric analysis of bone marrow lymphoid populations: a – CD45/SSC coordinates, the lymphocyte gate ($CD45^+$) is highlighted in green; б – lymphocyte gate: CD16/CD3 coordinates, NK cells ($CD16^+CD3^-$) – 12,3 % (in blue), CD3 cells – 20,2 % (in green)

$CD45^+$ -лимфоцитов в опухолевых срезах. Лимфоидная инфильтрация опухоли по группе в целом выявлена в 56,4 % случаев, при этом в 30 % образцов отмечена выраженная степень инфильтрации, а в 26,4 % – умеренная, что хорошо согласуется с результатами других исследователей. Пример выраженной лимфоидной инфильтрации представлен на рис. 2, 3. Т-клеточная инфильтрация была следующей: $CD3^+$ -клетки инфильтрировали опухоль выражено в 27 % случаев, тогда как 20,0 % образцов демонстрировали умеренную степень инфильтрации. В остальных случаях в опухоли обнаруживались единичные $CD3^+$ -клетки. Пропорция цитотоксических $CD8^+$ -клеток в опухоли была незначительной – лишь в 21,4 и 5,7 % наблюдений отмечено выраженное и умеренное их количество соответственно. Немного более выраженной была инфильтрация $CD4^+$ -клетками, что отмечено в 37 % случаев. $CD20^+$ -клетки либо отсутствовали, либо незначительно инфильтрировали опухоль. В 40 % образцов наблюдалась слабая и умеренная плазмочитарная ($CD38^+$) инфильтрация. Таким образом, полученные нами данные подтверждают, что в осуществлении противоопухолевого иммунного ответа ведущую роль играют Т-клетки.

Далее проанализирована лимфоидная инфильтрация опухоли при биологических подтипах РМЖ. Мы не обнаружили достоверной разницы в степени инфильтрации опухоли $CD45^+$ -клетками в зависимости от подтипа РМЖ ($p = 0,8$). Однако при нелюми-

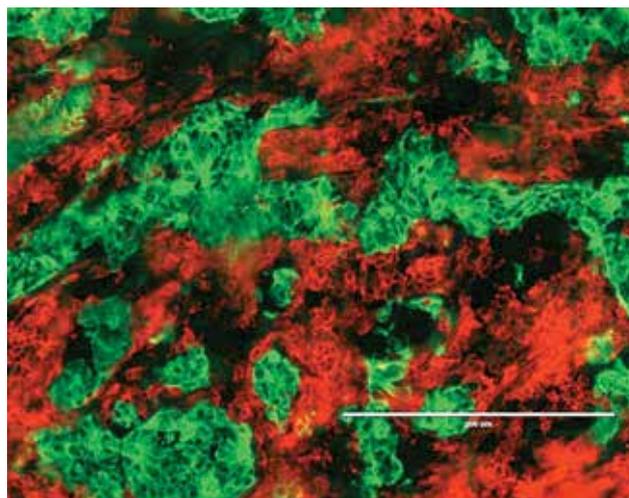


Рис. 2. Инфильтрация опухоли $CD45^+$ -клетками, выраженная степень ($\times 400$): экспрессия панэпителиального антигена KL-1 клетками рака молочной железы – зеленый цвет, экспрессия панлейкоцитарного антигена $CD45$ мононуклеарными клетками – красный цвет

Fig. 2. Tumor $CD45^+$ infiltration, pronounced degree ($\times 400$): panepithelial antigen KL-1 expression by breast cancer cells – in green, panleukocyte $CD45$ antigen expression by mononuclear cells – in red

нальном подтипе выраженная $CD45$ -инфильтрация наблюдалась несколько чаще, чем при люминальном (33 % против 26 %, $p = 0,80$) (табл. 4). И действительно, по данным литературы, имеется связь отрицательного рецепторного статуса с более выраженной

Таблица 4. Инфильтрация CD45⁺-клетками при люминальном и нелюминальном подтипах рака молочной железы ($p = 0,80$), n (%)

Table 4. CD45⁺ cell infiltration in luminal and non-luminal subtypes of breast cancer ($p = 0,80$), n (%)

Подтип рака молочной железы Breast cancer subtypes	Инфильтрация CD45 ⁺ -клетками CD45 ⁺ cell infiltration			Всего Total
	слабая weak	умеренная moderate	выраженная expressed	
Люминальный Luminal	28 (46,7)	16 (26,7)	16 (26,7)	60 (100)
Нелюминальный Non-luminal	13 (43,3)	7 (23,3)	10 (33,3)	30 (100)
Всего Total	41 (45,6)	23 (25,6)	26 (28,9)	90 (100)

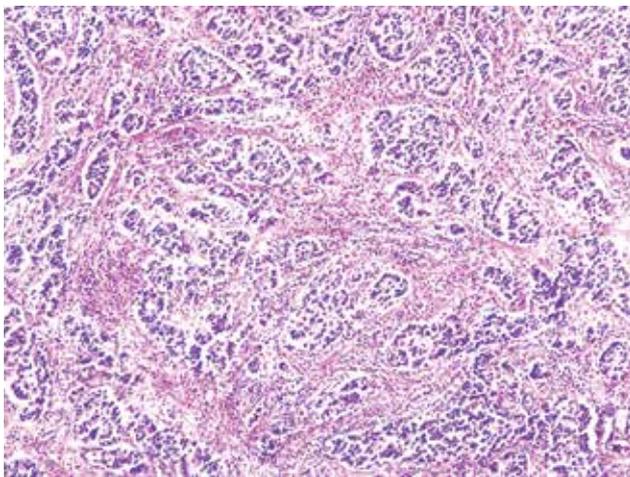


Рис. 3. Инвазивный протоковый рак молочной железы. В строме опухоли отмечается высокое содержание опухолинфилирующих лимфоцитов. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

Fig. 3. Invasive ductal breast cancer. The tumor stroma contains a high content of tumor-infiltrating lymphocytes. Hematoxylin and eosin staining, $\times 100$

лимфоидной инфильтрацией [15]. Изучая плазмоцитарную инфильтрацию (CD38⁺), мы установили, что она различалась в зависимости от подтипа РМЖ. При нелюминальном подтипе РМЖ плазмоцитарная инфильтрация была более значительной, что наблюдалось в виде мозаичной реакции в 50,0 % случаев ($n = 15$), тогда как при люминальном – только в 22,0 % ($n = 13$). Признаки были достоверно взаимосвязаны, $p = 0,016$ (рис. 4). Это дополнительно свидетельствует о наличии корреляции рецепторотрицательного статуса с инфильтрацией опухоли плазматическими клетками.

Известно, что выраженная инфильтрация опухоли лимфоцитами наблюдается при тройном негативном РМЖ, который, по последним научным данным, характеризуется более частыми экспрессией PDL-1 и ответом на иммунотерапию [30]. Иной характер иммунных реакций отмечен при люминальном РМЖ, который в сравнении с другими подтипами характеризуется более слабой лимфоидной инфильтрацией

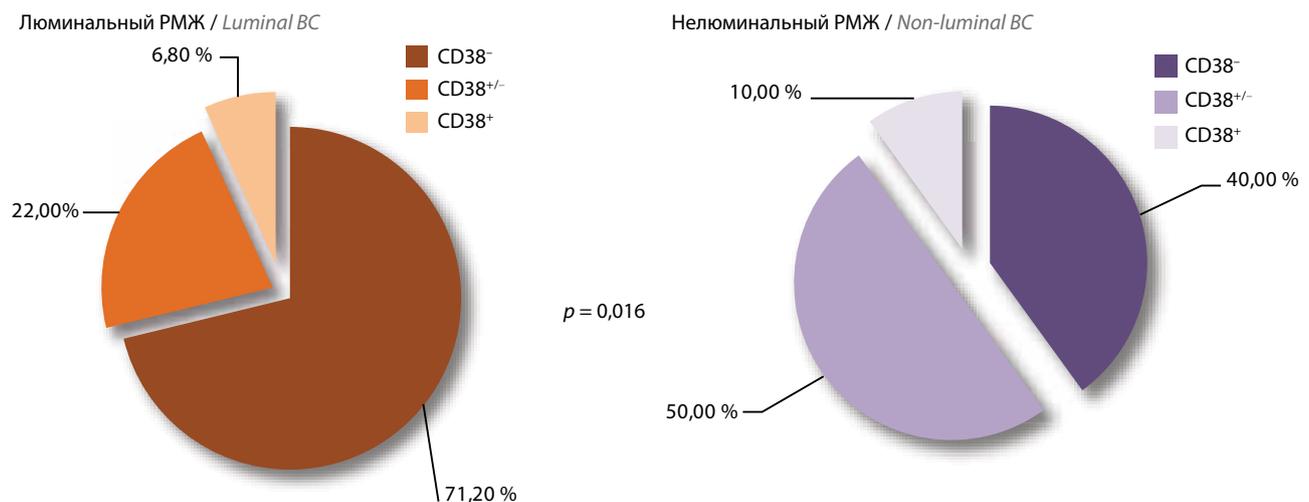


Рис. 4. Инфильтрация CD38⁺-клетками при люминальном и нелюминальном подтипах рака молочной железы (РМЖ)

Fig. 4. CD38⁺ cells infiltration in luminal and non-luminal subtypes of breast cancer (BC)

и, кроме того, низкой экспрессией PD-L1, что ассоциируется с резистентностью к иммунотерапии [22, 31, 32]. Принимая во внимание указанные данные литературы в отношении лимфоидной инфильтрации, мы предполагаем, что в нашей выборке нелюминального подтипа РМЖ, весьма вероятно, присутствовала значительная доля тройного негативного рака, который, как известно, хорошо отвечает на химиотерапию. Здесь уместно отметить, что, по результатам исследований, установлено преимущество лимфоидной инфильтрации в случаях экспрессии клетками рака молекул HLA I класса: при неoadвантной химиотерапии в таких опухолях чаще наблюдается полный патоморфологический ответ [19].

Следующим шагом стал анализ связи лимфоидной инфильтрации и морфологических параметров опухоли. Установлено, что размеры первичной опухоли (Т-категория) были взаимосвязаны со степенью лимфоидной инфильтрации (CD45⁺) ($p = 0,021$). CD4⁺-, а также CD8⁺-образцы наблюдались достоверно чаще при размерах опухоли, соответствующих Т1. CD4⁺-опухоли при Т1 составили 54,3 % против 18,8 % при Т2. Аналогично для CD8⁺-образцов: 38,9 % и 13,3 %, $p = 0,004$ (табл. 5). Таким образом, инфильтрация опухоли CD3⁺-клетками и их субпопуляциями достоверно отрицательно коррелировала с величиной первичной опухоли.

Таблица 5. CD4⁺-, CD8⁺-инфильтрация в зависимости от размера первичной опухоли (Т), n (%)

Table 5. CD4⁺, CD8⁺ infiltration depending on the size of the primary tumor (T), n (%)

Категория Т T category	CD4-клетки ($p = 0,031$) CD4 cells ($p = 0,031$)		Всего Total
	нет absence	есть presence	
Т1	16 (45,7)	19 (54,3)	35 (100)
Т2	26 (81,3)	6 (18,8)	32 (100)
Т3	2 (100)	0 (0)	2 (100)
	CD8-клетки ($p = 0,004$) CD8 cells ($p = 0,004$)		
Т1	22 (61,1)	14 (38,9)	36 (100)
Т2	26 (86,7)	4 (13,3)	30 (100)
Т3	2 (100)	0 (0)	2 (100)

Также следует отметить, что в целом по мере нарастания интенсивности общего уровня местных иммунных реакций по CD45 доля более ранних стадий РМЖ увеличивалась и, соответственно, уменьшалась доля более поздних стадий ($p = 0,071$) (табл. 6). Эти результаты хорошо согласуются с данными ли-

тературы и более ранних работ нашей лаборатории [18].

Таблица 6. Инфильтрация CD45⁺-клетками при раке молочной железы в зависимости от стадии, n (%)

Table 6. Infiltration of CD45⁺ cells in breast cancer depending on the stage, n (%)

Стадия Stage	CD45 ⁺ -клетки CD45 ⁺ cells		Всего Total
	нет absence	есть presence	
I	5 (25,0)	15 (75,0)	30 (100)
ПА	13 (44,8)	16 (55,2)	29 (100)
ПВ	20 (69,0)	9 (31,0)	29 (100)
ПИА	4 (50,0)	4 (50,0)	8 (100)
ПВВ	1 (50,0)	1 (50,0)	2 (100)
ПВС	2 (66,7)	1 (33,3)	3 (100)
Всего Total	45 (49,5)	46 (50,5)	91 (100)

Установлено, что при инфильтративно-протоковом РМЖ лимфоидная инфильтрация более выражена, чем при дольковом раке. CD45⁺-клетки слабо или умеренно инфильтрировали опухоль суммарно в 59,2 % случаев при протоковом и в 20 % случаев – при дольковом раке. Различия близки к достоверным ($p = 0,05$). Скопления CD3⁺-клеток в опухоли отмечены суммарно в 50,0 % образцов при протоковом раке, тогда как при дольковом – в 12,5 % ($p = 0,065$). CD8⁺-клетки, так же как и CD4⁺-клетки, преобладали при протоковой карциноме в сравнении с дольковым раком (рис. 5). Так, умеренное количество CD4⁺-клеток отмечено в 46 % (23/50) случаев протокового рака и в 18 % (2/11) случаев долькового РМЖ ($p = 0,076$) (табл. 7).

Далее проанализировано среднее содержание различных субпопуляций лимфоцитов костного мозга в зависимости от подтипа РМЖ (t-критерий для независимых выборок). Установлены различия между биологическими подтипами РМЖ (табл. 8). При люминальном подтипе содержание субпопуляций CD45RO⁺ было больше, чем при нелюминальном: средние значения составили $37,3 \pm 2,3$ % против $28 \pm 2,8$ % ($p = 0,04$). В отношении субпопуляции В-лимфоцитов наблюдалась иная картина. Количество CD19⁺CD38⁺-клеток при люминальном подтипе был меньше, чем при нелюминальном: $24,2 \pm 2$ % против $34,8 \pm 6$ % ($p = 0,041$). Привлекла внимание еще одна субпопуляция В-лимфоцитов: В1-клетки врожденного иммунитета (CD5⁺). Количество этих клеток составило $10,4 \pm 2,2$ и $7,7 \pm 1,7$ % при нелю-

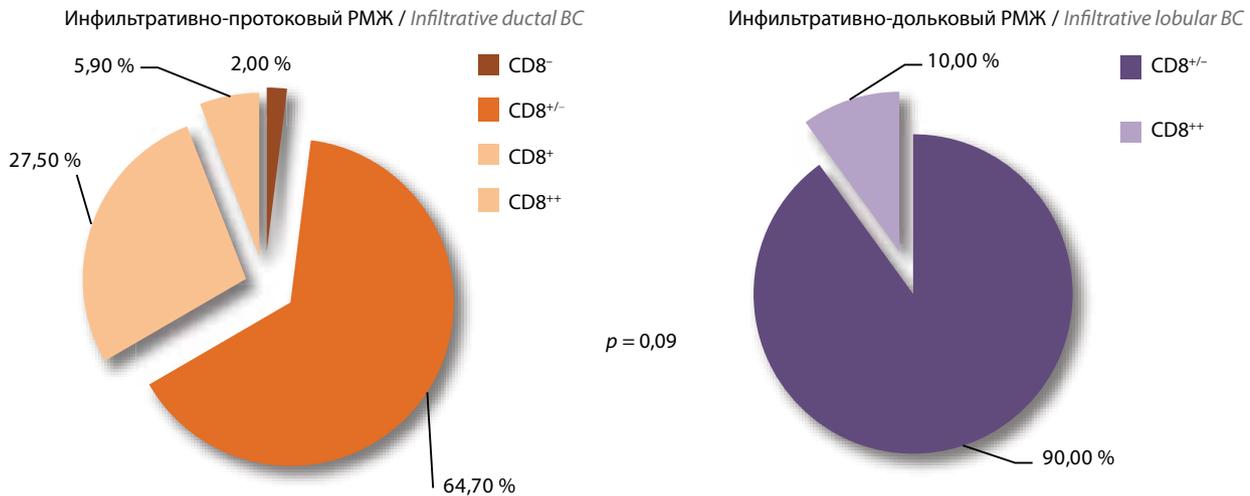


Рис. 5. Инфильтрация CD8⁺-клетками при инфильтративно-протоковом и инфильтративно-дольковом раке молочной железы (РМЖ)
Fig. 5. CD8⁺ cells infiltration in infiltrative ductal and infiltrative lobular breast cancer (BC)

Таблица 7. Инфильтрация CD4⁺-клетками при инфильтративно-протоковом и инфильтративно-дольковом раке молочной железы ($p = 0,076$), n (%)

Table 7. CD4⁺-cells infiltration in infiltrative ductal and infiltrative lobular breast cancer ($p = 0,076$) n (%)

Гистологический вид рака молочной железы Histological type of breast cancer	CD4 ⁺ -клетки CD4 ⁺ cells		Всего Total
	нет absence	есть presence	
Инфильтративно-протоковый Infiltrative ductal carcinoma	27 (54,0)	23 (46,0)	50 (100)
Инфильтративно-дольковый Infiltrative lobular carcinoma	9 (81,8)	2 (18,2)	11 (100)
Всего Total	36 (59,0)	25 (41,0)	61 (100)

минальном и люминальном подтипах соответственно. Однако количество больных в группе нелюминального рака невелико, и различия не достигли достоверности. Поэтому любые суждения и выводы по данному факту весьма затруднительны и преждевременны. Тем не менее такое совпадение увеличения содержания в костном мозге В-клеток врожденного иммунитета CD5⁺ и популяции плазматических клеток CD38⁺ позволяет задуматься о возможном напряжении противоопухолевого иммунного ответа при нелюминальном подтипе. С учетом выраженной лимфоидной инфильтрации это расширяет представления о его особенностях и приближает к пониманию иммунного ответа при данном биологическом подтипе РМЖ. Расшифровка связей между иммунной

системой костного мозга и локальными иммунными процессами в опухоли в дальнейшем может привести к формированию группы больных, селективная иммунотерапия у которых может иметь наибольшую эффективность. Поэтому необходимо накопление материала для уточнения обсуждаемого наблюдения.

При корреляционном анализе показателей лимфоидных популяций костного мозга и степени инфильтрации опухоли лимфоцитами нами выявлены интересные закономерности (табл. 9). Как видно, костномозговые лимфоидные популяции находятся в отрицательной корреляционной связи с интратуморальными лимфоцитами. Это не исключает регуляторного влияния соответствующих клеток с цитотоксическим потенциалом, а также клеток врожденного иммунитета на иммунные интратуморальные реакции. Установлена отрицательная корреляция плазмоцитарной инфильтрации CD38⁺ с популяциями НК-клеток: $R = -0,455$, $p = 0,044$. Аналогично отрицательная корреляция выявлена в отношении инфильтрирующей опухоль CD4⁺-клеток с уровнем В-предшественников: $R = -0,420$, $p = 0,021$. Отрицательная корреляция для CD8⁺-клеток выявлена с В1 (CD5⁺) – лимфоцитами: $R = -0,520$, $p = 0,047$. Также следует отметить корреляционные связи с маргинальной значимостью: отрицательная для CD3⁺-, CD8⁺-клеток с В-предшественниками ($0,05 < p < 0,1$). Эти факты являются новыми, требуют дальнейшего осмысления и тщательного анализа по мере накопления данных. На наш взгляд, случайность подобного рода ассоциаций, вероятно, может быть исключена. Предпосылкой может служить наблюдение, демонстрирующее выраженную пропорцию НК-клеток в костном мозге больных РМЖ по результатам исследования В.А. Мкртчян и соавт. [32]. Авторы установили, что

Таблица 8. Средние уровни костномозговых популяций лимфоцитов при раке молочной железы

Table 8. Mean levels of bone marrow lymphocyte populations in breast cancer

Популяции лимфоцитов Lymphocyte populations	Биологический подтип Biological subtype	n	M, %	SD	m	p
CD16 ⁺ CD3 ⁻ , CD56 ⁺ CD3 ⁻	Люминальный Luminal	26	11,16	15,087	2,95	>0,05
	Нелюминальный Non-luminal	9	9,23	6,16	2,05	
CD3 ⁺	Люминальный Luminal	39	63,09	11,92	1,90	>0,05
	Нелюминальный Non-luminal	10	61,50	9,84	3,11	
CD45RO ⁺	Люминальный Luminal	40	37,32	14,76	2,33	0,04
	Нелюминальный Non-luminal	12	28,02	9,86	2,84	
CD4 ⁺	Люминальный Luminal	40	39,21	10,25	1,62	>0,05
	Нелюминальный Non-luminal	13	41,29	13,12	3,64	
CD8 ⁺	Люминальный Luminal	40	43,28	12,90	2,04	>0,05
	Нелюминальный Non-luminal	13	42,72	11,75	3,26	
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	Люминальный Luminal	38	1,02	0,40	0,06	>0,05
	Нелюминальный Non-luminal	13	1,06	0,50	0,14	
CD8 ⁺ HLA-DR ⁺	Люминальный Luminal	36	9,07	12,42	2,07	>0,05
	Нелюминальный Non-luminal	11	8,83	6,24	1,88	
CD4 ⁺ CD25 ⁺	Люминальный Luminal	35	3,41	2,64	0,44	>0,05
	Нелюминальный Non-luminal	11	3,38	2,47	0,74	
CD19 ⁺	Люминальный Luminal	36	17,32	11,34	1,89	>0,05
	Нелюминальный Non-luminal	10	17,63	6,74	2,13	
CD19 ⁺ CD10 ⁺	Люминальный Luminal	35	15,65	18,03	3,04	>0,05
	Нелюминальный Non-luminal	11	13,98	15,56	4,69	
CD19 ⁺ CD38 ⁺	Люминальный Luminal	39	24,27	12,57	2,01	0,041
	Нелюминальный Non-luminal	12	34,87	22,29	6,43	
CD19 ⁺ CD5 ⁺	Люминальный Luminal	16	7,75	6,95	1,73	>0,05
	Нелюминальный Non-luminal	5	10,46	5,02	2,24	

Примечание. n – число пациентов; M – среднее значение; SD – стандартное отклонение; m – стандартная ошибка среднего.
Note. n – number of patients is the quantity; M – mean value; SD – standard deviation; m – standard error of the mean.

Таблица 9. Корреляционные связи костномозговых лимфоцитов с опухолинфильтрирующими лимфоцитами

Table 9. Correlations between bone marrow lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes

Популяции лимфоцитов костного мозга Bone marrow lymphocyte populations	Опухолинфильтрирующие лимфоциты Tumor infiltrating lymphocytes					
	CD45	CD3	CD4	CD8	CD20	CD38
CD16 ⁺ CD3 ⁻ , CD56 ⁺ CD3 ⁻						
R	0,216	0,000	0,045	-0,107	-0,344	-0,455
p	0,347	1,000	0,832	0,636	0,149	0,044
n	21	21	25	22	19	20
CD19 ⁺ CD10 ⁺						
R	-0,153	-0,323	-0,420	-0,340	0,280	-0,089
p	0,437	0,094	0,021	0,077	0,166	0,659
n	28	28	30	28	26	27
CD19 ⁺ CD5 ⁺						
R	-0,271	-0,178	-0,217	-0,520	-0,062	0,023
p	0,309	0,510	0,438	0,047	0,827	0,935
n	16	16	15	15	15	15

более высокие уровни субпопуляций NK-клеток (CD16⁺CD3⁻, CD56⁺CD3⁻) наблюдались при опухолях с низким индексом пролиферативной активности (Ki-67⁺ < 20 %). Поэтому целесообразны дальнейшие исследования и, возможно, стоит не ограничиваться основными популяциями лимфоидных клеток, а включить и минорные субпопуляции, которые мало изучены. В недавней работе, посвященной изучению популяций костного мозга больных раком легкого, выявлена связь минорных популяций цитотоксических CD4-лимфоцитов и CD27-лимфоцитов, содержащих перфорин, с гистологическим типом опухоли [29].

Закключение

Лимфоидная инфильтрация при РМЖ наблюдается в 50,5 % случаев, при этом в 30 % образцов – выраженная, а в 26,4 % – умеренная. Доля цитотоксических CD8⁺-клеток в опухоли была незначительной, в 21,4 % наблюдений отмечена выраженная инфильтрация. Немного больше составляла доля CD4⁺-клеток. При нелюминальном подтипе выраженная степень CD45-инфильтрации наблюдалась несколько чаще, чем при люминальном. В 40 % опухолей отме-

чена плазмочитарная (CD38⁺) инфильтрация, при этом она была более выражена при нелюминальном подтипе. Размер первичной опухоли (индекс Т), стадия, гистологический вид опухоли были взаимосвязаны со степенью лимфоидной инфильтрации. Интенсивность общего уровня местных иммунных реакций по CD45 положительно коррелировала с ранними стадиями. При инфильтративно-протоковом РМЖ лимфоидная инфильтрация более выражена, чем при дольковом раке.

Субпопуляции костномозговых лимфоцитов были связаны с подтипом РМЖ. Содержание CD45RO⁺-клеток при люминальном подтипе было достоверно повышено, тогда как содержание CD19⁺-CD38⁺-клеток – понижено. Иммунокомпетентные клетки, инфильтрирующие опухоль, находятся в отрицательной корреляционной связи с костномозговыми лимфоидными популяциями: CD38⁺-клетки – с уровнем NK-клеток костного мозга, CD4⁺-клетки – с уровнем В-предшественников, CD3⁺-, CD8⁺-клетки – с уровнем В-предшественников. Отрицательная корреляция CD8⁺-клеток отмечена с уровнем В1-лимфоцитов CD5⁺.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Global Cancer Statistics 2020. IARC. Available at: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>.
2. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I. et al. Cancer statistics for the year 2020: an overview. *Int J Cancer* 2021;149:778–89. DOI: 10.1002/ijc.33588
3. De Sousa V.M.L., Carvalho L. Heterogeneity in lung cancer. *Pathobiology* 2018;85(1–2):96–107. DOI: 10.1159/000487440
4. Чулкова С.В., Маркина И.Г., Антипова А.С. и др. Роль стволовых опухолевых клеток в канцерогенезе и прогнозе меланомы. *Вестник Российского научного центра рентгено-радиологии* 2018;18(4):100–16.
5. Chulkova S.V., Markina I.G., Antipova A.S. et al. The role of stem tumor cells in carcinogenesis and the forecast of melanoma. *Vestnik rossiyskogo nauchnigo centra rentgenoradiologii = Bulletin of the Russian Scientific Center for Roentgen Radiology* 2018;18(4):100–16. (In Russ.).
6. Chernysheva O., Markina I., Demidov L. et al. Bone marrow involvement in melanoma. Potentials for detection

- of disseminated tumor cells and characterization of their subsets by flow cytometry. *Cells* 2019;8(6):627. DOI: 10.3390/cells8060627
6. Schüler-Toprak S., Weber F., Skrzypczak M. et al. Expression of estrogen-related receptors in ovarian cancer and impact on survival. *Cancer Res Clin Oncol* 2021;147(9):2555–67. DOI: 10.1007/s00432-021-03673-9
 7. Чулкова С.В. Биомаркеры стволовых клеток желудка. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии 2018;21(10):11–7. DOI: 10.29296/25877313-2018-10-02
Chulkova S.V. Stomach cancer stem cell biomarkers. *Voprosi biologicheskoy, medicinskoj i farmatsevticheskoy khimii = Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry* 2018;21(10):11–7. (In Russ.). DOI: 10.29296/25877313-2018-10-02
 8. Chang R.B., Beatty G.L. The interplay between innate and adaptive immunity in cancer shapes the productivity of cancer immunosurveillance. *J Leukoc Biol* 2020;108(1):363–76. DOI: 10.1002/JLB.3MIR0320-475R
 9. Чулкова С.В., Стилиди И.С., Глухов Е.В. и др. Селезенка – периферический орган иммунной системы. Влияние спленэктомии на иммунный статус. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 2014;25(1–2(94)):21–5.
Chulkova S.V., Stilidi I.S., Glukhov E.V. et al. The spleen as a peripheral immunity organ. Splenectomy effect on the immunity status. *Vestnik RONC im. N.N. Blokhina RAMN = Journal of N.N. Blokhin Russian Oncology Center* 2014; 25(1–2(94)):21–5. (In Russ.).
 10. Gerada Ch., Ryan K.M. Autophagy, the innate immune response and cancer. *Mol Oncol* 2020;14(9):1913–29. DOI: 10.1002/1878-0261.12774
 11. Чулкова С.В., Шолохова Е.Н., Грищенко Н.В. и др. Ключевая роль популяций В1-лимфоцитов в иммунном ответе у больных раком желудка. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(4):64–70. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-64-70
Chulkova S.V., Sholokhova E.N., Grishchenko N.V. et al. The role of B1 lymphocytes in the antitumor immunity in patients with gastric cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(4):64–70. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-64-70
 12. Huszno J., Nożyńska E.Z., Lange D. et al. The association of tumor lymphocyte infiltration with clinicopathological factors and survival in breast cancer. *Pol J Pathol* 2017;68(1):26–32. DOI: 10.5114/pjp.2017.67612
 13. Li J., Byrne K.T., Yan F. et al. Tumor cell-intrinsic factors underlie heterogeneity of immune cell infiltration and response to immunotherapy. *Immunity* 2018;49:178–93.e7. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.06.006
 14. Gooden M.J.M., De Bock G.H., Leffers N. et al. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer* 2011;105(1):93–103. DOI: 10.1038/bjc.2011.189
 15. Артамонова Е.В. Роль иммунофенотипирования в диагностике и прогнозе рака молочной железы. *Иммунология гемопоза* 2009;1(9):8–52.
Artamonova E.V. The role of immunophenotyping in the diagnosis and prognosis of breast cancer. *Immunologiya gemopoeza = Hematopoiesis Immunology* 2009;1(9):8–52. (In Russ.).
 16. De Groot A.F., Blok E.J., Charehbili A. Strong CD8+ lymphocyte infiltration in combination with expression of HLA class I is associated with better tumor control in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2019;175(3):605–15. DOI: 10.1007/s10549-019-05195-y
 17. Заботина Т.Н., Черткова А.И., Борунова А.И. и др. Взаимосвязь субпопуляций лимфоцитов больных раком молочной железы с результатами лечения. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(3):25–33. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-25-33
Zabotina T.N., Chertkova A.I., Borunova A.A. et al. Relationship of lymphocyte subpopulations in breast cancer patients with treatment results. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2021;20(3):25–33. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-25-33
 18. Субботина А.В., Летыгин В.П., Тупицын Н.Н. и др. Роль иммунофенотипирования рака молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии. *Иммунология гемопоза* 2009;1(9):52–79.
Subbotina A.V., Letyagin V.P., Tupitsyn N.N. et al. The role of breast cancer immunophenotyping in the process of neoadjuvant chemotherapy. *Immunologiya gemopoeza = Hematopoiesis Immunology* 2009;6(1):52–79. (In Russ.).
 19. Denkert C., Von Minckwitz G., Darb-Esfahani S. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol* 2018;19(1):40–50. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30904-X
 20. Буров Д.А., Безнос О.А., Воротников И.К. и др. Клиническое значение экспрессии молекул гистосовместимости на клетках рака молочной железы. *Иммунология гемопоза* 2016;2(14):33–53.
Burov D.A., Beznos O.A., Vorotnikov I.K. et al. Clinical significance of histocompatibility molecules expression in breast cancer cells. *Immunologiya gemopoeza = Hematopoiesis Immunology* 2016;2(14):33–53. (In Russ.).
 21. Axelrod M.L., Cook R.S., Johnson D.B. et al. Biological consequences of MHC-II expression by tumor cells in cancer. *Clin Cancer Res* 2019;25:2392–402. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3200
 22. Горбунова Т.В., Поляков В.Г., Серебрякова И.Н. и др. Сравнительный анализ субпопуляционного состава лимфоцитов костного мозга у детей при мелкоклеточных саркомах. *Иммунология* 2012;33(1):37–44.
Gorbunova T.V., Polyakov V.G., Serebryakova I.N. et al. Comparative analysis of the subpopulation composition of bone marrow lymphocytes in children with small cell sarcomas. *Immunology* 2012;33(1):37–44. (In Russ.).
 23. Feuerer M., Rocha M., Bai L. Enrichment of memory T cells and other profound immunological changes in the bone marrow from untreated breast cancer patients. *Int J Cancer* 2001;92(1):96–105.
 24. Рябчиков Д.А., Безнос О.А., Дудина И.А. и др. Диссеминированные опухолевые клетки у пациентов с люминальным раком молочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(1):53–7. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-53-57
Ryabchikov D.A., Beznos O.A., Dudina I.A. et al. Disseminated tumor cells in patients with luminal breast cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(1):53–7. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-53-57
 25. Solomayer E.F., Feuerer M., Bai L. et al. Influence of adjuvant hormone therapy and chemotherapy on the immune system analyzed in the bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9(1):174–80.
 26. Тупицын Н.Н., Джуманазаров Т.М., Палладина А.Д. и др. Иммунологические показатели костного мозга больных не-мелкоклеточным раком легкого. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(2):47–54. DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-2-47-54
Tupitsyn N.N., Dzhumanazarov T.M., Palladina A.D. et al. Immunological parameters of bone marrow of patients in non-small cell lung cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(2):47–54. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-2-47-54
 27. Goldberg J., Pastorello R.G., Vallius T. et al. The immunology of hormone receptor positive breast cancer. *Front Immunol* 2021;12:674192. DOI: 10.3389/fimmu.2021.674192

28. Thompson E., Taube J.M., Elwood H. et al. The immune microenvironment of breast ductal carcinoma in situ. *Mod Pathol* 2016;29(3):249–58. DOI: 10.1038/modpathol.2015.158
29. Sobral-Leite M., Van de Vijver K., Michaut M. et al. Assessment of PD-L1 expression across breast cancer molecular subtypes, in relation to mutation rate, BRCA1-like status, tumor-infiltrating immune cells and survival. *Oncoimmunology* 2018;7(12):e1509820. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1509820
30. Retecki K., Seweryn M., Graczyk-Jarzynka A., Bajor M. The immune landscape of breast cancer: strategies for overcoming immunotherapy resistance. *Cancers (Basel)* 2021;13(23):6012. DOI: 10.3390/cancers13236012
31. Soysal S.D., Tzankov A., Muenst S.E. Role of the tumor microenvironment in breast cancer. *Pathobiology* 2015;82(3–4):142–152. DOI: 10.1159/000430499
32. Мкртчян В.А., Воротников И.К., Чернышева О.А. и др. Взаимосвязь между НК-клетками костного мозга больных раком молочной железы и биологическими особенностями опухоли и эритропозом. *Онкогинекология* 2019;(3):4–13. Mkrtychyan V.A., Vorotnikov I.K., Chernysheva O.A. et al. Relationship between bone marrow NK cells in breast cancer patients and tumor biological characteristics and erythropoiesis. *Onkoginekologiya = Oncogynecology* 2019;(3):4–3. (In Russ.).

Вклад авторов

С.В. Чулкова: анализ данных, написание текста рукописи, перевод на английский язык, оформление рукописи;

Е.Н. Шолохова: получение и анализ данных;

И.В. Поддубная, И.С. Стилиди: анализ рукописи;

А.В. Егорова: получение и анализ данных, оформление рукописи;

Н.А. Козлов: получение и анализ данных, анализ рукописи;

Н.Н. Тупицын: дизайн исследования, анализ данных, анализ рукописи.

Authors' contribution:

S.V. Chulkova: data analysis, manuscript writing, translation into English, manuscript design;

E.N. Sholokhova: data acquisition and analysis;

I.V. Poddubnaya, I.S. Stilidi: manuscript analysis;

A.V. Egorova: data acquisition and analysis, manuscript design;

N.A. Kozlov: data acquisition and analysis, manuscript analysis;

N.N. Tupitsyn: study design, data analysis, manuscript analysis.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.В. Чулкова / S.V. Chulkova: <https://orcid.org/0000-0003-4412-5019>

Е.Н. Шолохова / E.N. Sholokhova: <https://orcid.org/0000-0002-1456-1904>

И.В. Поддубная / I.V. Poddubnaya: <https://orcid.org/0000-0002-0995-1801>

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

А.В. Егорова / A.V. Egorova: <https://orcid.org/0000-0003-3904-8530>

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

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

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: 22.08.2022. Принята к публикации: 05.12.2022.

Article received: 22.08.2022. Accepted for publication: 05.12.2022.

Анемический синдром, ассоциированный со злокачественными новообразованиями, у больных колоректальным раком

В. Н. Блиндарь, М. М. Добровольская, Г. Н. Зубрихина, Т. В. Давыдова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Валентина Николаевна Блиндарь bld51@list.ru

Введение. Колоректальный рак (КРР) является наиболее часто диагностируемым злокачественным новообразованием. Это заболевание сопровождается развитием анемического синдрома (АС). Данное осложнение не только ухудшает результаты лечения и, соответственно, отрицательно влияет на общую выживаемость, но и снижает качество жизни пациентов, уменьшает приверженность к лечению.

Цель работы – исследовать экспрессию гепсидина 25 (ГП25), прогепсидина (ПРОГП), показатели ферритина (ФР), интерлейкина 6 (ИЛ-6) и метаболитов оксида азота (NO_x) в периферической крови больных КРР, оценить их взаимосвязь с клиническим течением заболевания и АС.

Материалы и методы. Исследование проведено среди 41 больного КРР с АС. Содержание ФР, ПРОГП, ГП25, ИЛ-6 определяли с помощью иммуноферментного метода. Общее содержание NO_x в сыворотке крови определяли при помощи реактива Грисса после восстановления нитрата до нитрита гранулами кадмия в присутствии цинка.

Результаты. Выделены 3 типа АС, характерной особенностью которых были микроцитоз (МСV – $74,3 \pm 2,1$ фл) и гипохромия (МСН – $22,9 \pm 1,2$ пг) эритроцитов. Первый тип АС – железодефицитная анемия (ЖДА), 2-й тип – анемия хронических заболеваний (АХЗ) в сочетании с железодефицитным эритропоэзом и 3-й – АХЗ с функциональным дефицитом железа (ФДЖ). Истинная ЖДА была выявлена у 15 (36,6 %) человек и характеризовалась классически – низкой концентрацией ФР, ПРОГП, ГП25, ИЛ-6 и NO_x . У менее значительной группы (9 человек, 21,9 %) были выявлены высокие концентрации ФР и низкие ПРОГП, ГП25, ИЛ-6, NO_x , что свидетельствовало о дефиците железа на фоне АХЗ (железодефицитный эритропоэз). Она отличалась от первой группы (с ЖДА) значительной концентрацией ФР, что может свидетельствовать о переходе ЖДА в хроническую фазу АС. Третья группа – с ФДЖ – оказалась самой многочисленной (17 человек, 41,5 %), отличалась высокими концентрациями ФР ($386,7 \pm 41,2$ нг/мл), ГП25 ($43,2 \pm 7,1$ нг/мл), ПРОГП ($283,3 \pm 18,5$ нг/мл), ИЛ-6 ($24,8 \pm 5,5$ пг/мл), NO_x ($39,7 \pm 5,5$ мкмоль/л); показатели были достоверно выше ($p < 0,001$), чем у больных с ЖДА и АХЗ с железодефицитным эритропоэзом.

Заключение. У больных с распространенным опухолевым процессом чаще всего выявляется АС с ФДЖ. ФДЖ сопровождался гиперпродукцией ФР, ИЛ-6, ГП25, ПРОГП и NO_x . Отмечена тесная корреляционная связь между исследуемыми показателями и увеличением Т-стадии КРР, что может свидетельствовать о взаимосвязи этих белков с развитием цитокининдуцированной анемии онкологических больных. Полученные данные могут быть использованы для оценки состояния метаболических нарушений при анемиях, ассоциированных со злокачественными новообразованиями, для дифференциальной диагностики вариантов АС и адекватного лечения.

Ключевые слова: колоректальный рак, анемия, функциональный дефицит железа, ферритин, гепсидин 25, прогепсидин, интерлейкин 6, оксид азота

Для цитирования: Блиндарь В. Н., Добровольская М. М., Зубрихина Г. Н., Давыдова Т. В. Анемический синдром, ассоциированный со злокачественными новообразованиями, у больных колоректальным раком. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(1):62–7. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-62-67

Anemia syndrome associated with malignant neoplasms in patients with colorectal cancer

Valentina N. Blindar, Marina M. Dobrovolskaya, Galina N. Zubrikhina, Tatiana V. Davydova

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

Contacts: Valentina Nikolaevna Blindar *bld51@list.ru*

Background. Colorectal cancer is the most commonly diagnosed cancer among all malignant neoplasms. This disease is accompanied by the development of anemic syndrome (AS). This complication not only worsens the results of treatment and, as a result, reduces overall survival, but also reduces the quality of life of patients, reduces adherence to treatment.

Aim. To study the expression of hepcidin 25 (HP25), prohepcidin (PROHP), ferritin (FR), interleukin 6 (IL-6) and metabolites of nitric oxide (NO_x) in the peripheral blood of patients colorectal cancer, to assess their relationship with the clinical course of the disease and with AS.

Materials and methods. The study was conducted in 41 patients with colorectal cancer and AS. The content of FR, PROHP, HP25, IL-6 was determined using enzyme immunoassay. The total content of NO_x in blood serum was determined using the Griess reagent after the reduction of nitrate to nitrite with cadmium granules in the presence of zinc.

Results. There are three types of AS. A characteristic feature of which was microcytosis ($\text{MCV} - 74.3 \pm 2.1 \text{ fl}$) and hypochromia ($\text{MHC} - 22.9 \pm 1.2 \text{ pg}$) of erythrocytes. Type 1 of AS – iron deficiency anemia (IDA), type 2 – anemia of chronic diseases (ACD) in combination with iron deficiency erythropoiesis and type 3 – ACD with functional iron deficiency (FID). True IDA was detected in 15 (36.6 %) patients, which was classically characterized by: low concentration of FR, PROHP, GP25, IL-6 and NO_x . A less significant group (9 patients, 21.9 %) had a high concentration of FR and low PROHP, GP25, IL-6, NO_x , which indicated iron deficiency against the background of ACD. It differed from the first group with IDA in a significant concentration of FR, which may indicate the transition of IDA to the chronic phase of AS. Third group (17 patients, 41.5 %) – with FID – turned out to be the most numerous and characterized by a high concentration of FR ($386.7 \pm 41.2 \text{ ng/ml}$), GP25 ($43.2 \pm 7.1 \text{ ng/ml}$), PROHP ($283.3 \pm 18.5 \text{ ng/ml}$), IL-6 ($24.8 \pm 5.5 \text{ pg/ml}$), NO_x ($39.7 \pm 5.5 \mu\text{mol/l}$), the values were significantly higher ($p < 0.001$) than in patients with IDA and ACD with iron deficiency erythropoiesis.

Conclusion. In patients with a widespread tumor process, AS with FID is most often detected. FID was accompanied by hyperproduction of FR, IL-6, GP25, PROHP and NO_x . A close correlation was noted between the studied parameters with an increase in the T-stage of colorectal cancer. This may indicate the relationship of these proteins in the development of cytokine-induced anemia in cancer patients. The data obtained can be widely used to assess the state of metabolic disorders in anemia associated with malignant neoplasms for the differential diagnosis of AS variants and adequate treatment.

Keywords: colorectal cancer, anemia, functional iron deficiency, ferritin, hepcidin 25, prohepcidin, interleukin 6, nitric oxide

For citation: Blindar V.N., Dobovolskaya M.M., Zubrikhina G.N., Davydova T.V. Anemia syndrome associated with malignant neoplasms in patients with colorectal cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2023;22(1):62–7. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-62-67

Введение

Колоректальный рак (КРР) является наиболее часто диагностируемым злокачественным новообразованием. Это заболевание сопровождается развитием анемического синдрома (АС). Данное осложнение не только ухудшает результаты лечения и, как следствие, отрицательно влияет на общую выживаемость, но и снижает качество жизни пациентов, уменьшает приверженность к лечению [1, 2]. АС сопровождается развитием тканевой гипоксии, которая, в свою очередь, активизирует процессы окислительного стресса и приводит к повышенному высвобождению биологически активных соединений, в частности метаболитов оксида азота (NO_x). Один из наиболее современных подходов к диагностике и терапии АС при онкологических заболеваниях – оценка уровня гепсидина 25 (ГП25) и терапевтическое воздействие на него. ГП25 – секретлируемый печенью пептидный гормон, который регулирует системный и локальный гомеостаз железа [2]. Есть данные, свидетельствующие о том, что наряду с ГП25 NO_x играет значитель-

ную роль в развитии цитокининдуцированной анемии, обусловленной активацией провоспалительных цитокинов, в частности ИЛ-6 [3, 4]. Широкий спектр проблем, связанных с АС и осложняющих лечение онкологического заболевания, делает вопросы диагностики и эффективного лечения АС чрезвычайно востребованными и актуальными.

Цель работы – исследовать экспрессию ГП25, прогепсидина (ПРОГП), показатели ферритина (ФР), интерлейкина 6 (ИЛ-6) и NO_x в периферической крови больных КРР, оценить их взаимосвязь с клиническим течением заболевания и АС.

Материалы и методы

Исследование проведено у 41 больного КРР с АС до лечения (в том числе 25 мужчин и 16 женщин) в возрасте от 34 до 88 лет (средний возраст $61,5 \pm 1,7$). I стадия заболевания выявлена у 2 больных, II стадия – у 9, III стадия – у 21, IV стадия – у 9 больных. Контрольная группа состояла из 50 человек соответствующего возраста без онкопатологии.

Расширенный клинический анализ крови выполняли на гематологическом анализаторе Sysmex ХЕ-2100 (Sysmex, Япония). В плазме крови методом иммуноферментного анализа определяли содержание ФР и ПРОГП с помощью наборов фирмы Orgentec Diagnostika GmbH (Германия), ГП25 – с помощью наборов от Peninsula Laboratories International, Inc. (США), ИЛ-6 – с помощью наборов Bender MedSystems (Австрия).

Общее содержание нитрита/нитрата (NO_x) в сыворотке крови определяли при помощи реактива Грисса после восстановления нитрата до нитрита гранулами кадмия в присутствии цинка и измеряли при длине волны 546 нм [5]. Результаты выражали в микромолях на 1 л сыворотки. Метод определения содержания NO_x при помощи реактива Грисса относительно простой, хорошо воспроизводимый и наиболее приемлемый как в научных, так и в клинических исследованиях. При этом следует иметь в виду, что реактив Грисса не позволяет определять концентрацию нитрат-иона, поэтому предварительно необходимо восстановить нитрат до нитрита. Для этого в качестве восстановителя используют фермент нитрат-редуктазу либо гранулированный кадмий или ванадий [6]. Концентрацию нитрита регистрируют по азо-красителю, образующемуся в реакции диазотирования нитритом сульфаниламида, входящего в состав реактива Грисса. В данной работе при исследовании суммарного содержания метаболитов NO_x в параллельных опытах были использованы в качестве восстановителя нитрат-редуктаза и гранулированный кадмий. Оба метода хорошо воспроизводимы, полученные результаты практически полностью сопоставимы и не зависят от примененного восстановителя.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программных пакетов MS Excel BioStat, версия 2016 г. Для оценки достоверности результатов использовали t-критерий Стьюдента. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05. Исследования выполняли в соответствии с принципами Хельсинкской декларации, разработанной Всемирной медицинской ассоциацией [7].

Результаты и обсуждение

В течение длительного времени искали претендента на роль гуморального регулятора метаболизма железа. В разное время предполагалось, что возможными кандидатами могут быть и ФР, и трансферрин, и растворимые рецепторы трансферрина [8, 9]. В настоящее время считают, что основную роль в метаболизме железа играет ГП25. ГП25 является 25-аминокислотным пептидом, который синтезируется в печени. Он образуется из 84-аминокислотного предшественника – ПРОГП. ГП25 – ключевой ре-

гулятор системного гомеостаза железа [8, 9]. ГП25 играет важную роль в нарушении обмена железа у онкологических больных с анемией хронического заболевания (АХЗ): он уменьшает всасывание железа в двенадцатиперстной кишке и блокирует высвобождение его макрофагами под воздействием провоспалительного цитокина ИЛ-6. В результате развивается функциональный дефицит железа (ФДЖ). ФДЖ называют ситуацией, когда, несмотря на достаточные запасы железа, эритропоэз неадекватно обеспечивается железом [8–10].

В настоящее время разработана и утверждена методика сывороточного иммуноферментного анализа ГП25. Авторами установлено, что этот метод в сыворотке или в плазме крови дает точные и воспроизводимые результаты [9–11]. Исследование содержания ГП25 проведено нами у 50 человек без онкопатологии с помощью иммуноферментного анализа. Показатели ГП25 варьировали в пределах 0,8–7,5 нг/мл, в среднем по группе составили $4,6 \pm 0,06$ нг/мл как у мужчин, так и у женщин, что соответствовало данным литературы [9, 10]. Содержание ПРОГП у здоровых людей колебалось от 57,3 до 157,1 нг/мл, в среднем по группе составило $99,8 \pm 9,3$ нг/мл, медиана – 115 нг/мл.

Содержание ФР в этой группе составило в среднем $97,9 \pm 16,5$ нг/мл с колебаниями от 31 до 187 нг/мл, медиана – 78,1 нг/мл. У мужчин значения ФР составили $102,4 \pm 11,9$ нг/мл, у женщин – $67,7 \pm 10,5$ нг/мл.

Величина ИЛ-6 не превышала 4,6 пг/мл, в среднем составив $2,0 \pm 0,4$ пг/мл, медиана – 1,5 пг/мл. Содержание NO_x колебалось от 13,6 до 63,6 мкмоль/л и составило в среднем $27,8 \pm 0,8$ мкмоль/л, что полностью сопоставимо с данными других авторов, определявших уровень метаболитов NO_x при помощи реактива Грисса [5, 6].

Анемический синдром определяли на основании классификации Всемирной организации здравоохранения. Критериями для диагностики АС считаются: у мужчин – уровень гемоглобина менее 130 г/л, гематокрит менее 39 %; у женщин – уровень гемоглобина менее 120 г/л, гематокрит менее 36 % [12]. АС онкологических больных протекает по типу АХЗ. АХЗ – собирательное понятие. Данное состояние развивается на фоне длительно протекающих заболеваний, поэтому имеет разные этапы формирования нарушений эритропоэза и метаболизма железа.

При анализе лабораторных данных обследуемых больных КРР были выделены 3 типа АС, характерной особенностью которых были микроцитоз и гипохромия эритроцитов (средний объем эритроцитов – $74 \pm 2,1$ фл, среднее содержание гемоглобина в эритроците – $22,9 \pm 1,2$ пг), Первый тип АС – железodefицитная анемия (ЖДА), 2-й тип – АХЗ в сочетании с железodefицитным эритропоэзом (ЖДЭ) и 3-й – АХЗ с ФДЖ. Истинная ЖДА, которая

характеризовалась классически: низкой концентрацией ФР ($13,2 \pm 1,5$ нг/мл), ПРОГП, ГП25, ИЛ-6 и NO_x (рис. 1), была выявлена у 15 (36,6 %) человек. Менее значительная группа (9 человек, 21,9 %) отличалась от первой группы (с ЖДА) значительной концентрацией ФР ($194,6 \pm 12,2$ нг/мл), что может свидетельствовать о переходе ЖДА в хроническую фазу АС. Несмотря на условно «большие запасы железа», ФР, являясь острофазным белком, вероятнее всего, необъективно отражал запасы железа.

Самой многочисленной (17 человек, 41,5 %) оказалась группа с ФДЖ, результаты которой отличались высокими концентрациями ФР ($386,7 \pm 41,2$ нг/мл), ГП25 ($43,2 \pm 7,1$ нг/мл), ПРОГП ($283,3 \pm 18,5$ нг/мл), ИЛ-6 ($24,8 \pm 5,5$ пг/мл), NO_x ($39,7 \pm 5,5$ мкмоль/л). Показатели в этой группе были достоверно выше ($p < 0,001$), чем у больных с ЖДА и ЖДЭ (см. рис. 1).

При сравнении уровня значений вариационного ряда выявлена тесная корреляционная связь между ИЛ-6 и ГП25 ($r = 0,67, p < 0,01$), NO_x ($r = 0,75, p < 0,01$) и, в меньшей степени, с ФР ($r = 0,53, p < 0,05$) и ПРОГП ($r = 0,59, p < 0,05$). Такую же закономерность прослеживали при корреляционной зависимости этих показателей от стадии заболевания. Установлена достоверная связь между уровнем ИЛ-6, ГП25, NO_x , ПРОГП и стадией опухоли ($r = 0,83, p < 0,001$) у больных КРР с АС.

Полученные результаты не противоречат данным литературы. Так, ряд авторов показали, что ФР, ГП25,

ИЛ-6 выявляются в более высоких концентрациях в сыворотке крови многих больных раком, и более высокие уровни коррелируют с агрессивным заболеванием и плохим клиническим исходом [13–17]. В частности, клинические исследования показали, что повышенные концентрации ИЛ-6 в сыворотке крови у пациентов связаны с продвинутыми стадиями опухоли при различных видах рака (например, КРР, почечно-клеточный рак, рак предстательной железы, молочной железы и яичников) и короткой выживаемостью пациентов. На фоне онкологических заболеваний обнаруживают более высокие уровни ФР в плазме крови многих больных. Такая же ситуация прослеживается, по данным литературы, с ГП25, самые высокие значения которого выявляются у больных с неблагоприятными прогностическими признаками [14, 17]. Мы продемонстрировали в нашем исследовании, что экспрессия ГП25 в плазме крови была положительно связана с увеличением Т-стадии КРР ($p < 0,001$).

Учитывая важную роль NO_x в развитии окислительного стресса и эндогенной интоксикации при опухолевой патологии, необходимо было рассмотреть возможность взаимоотношений в системе кровотока и активности NO_x . Как и по предыдущим параметрам, прослеживали такую же ситуацию по результатам исследования NO_x – самые высокие значения выявлены в группе пациентов с III–IV стадиями заболевания. При этом в литературе есть данные, свидетельствующие о том, что показатели NO_x не зависят от стадии злокачественного процесса [13]. Такое разночтение можно объяснить тем, что авторы не анализировали группы больных с АС.

Выявлены достоверные различия ($p < 0,012$) по количеству эритроцитов, уровню гемоглобина, которые были значительно ниже в группе больных с III–IV стадиями заболевания (рис. 2).

Другую закономерность прослеживали при анализе значений ФР, ПРОГП, ГП25, ИЛ-6 и NO_x – данные показатели значительно превышали таковые у больных с I–II стадиями заболевания (рис. 3). Следует подчеркнуть, что АС с ФДЖ в большинстве случаев выявляли у больных с распространенным опухолевым процессом (III–IV стадия). У больных с I–II стадиями заболевания чаще встречались ЖДА и ЖДЭ.

Заключение

Таким образом, у больных с распространенным опухолевым процессом чаще всего выявляют АС с ФДЖ. ФДЖ сопровождается гиперпродукцией ФР, ИЛ-6, ГП25, ПРОГП и NO_x . Отмечена тесная корреляционная связь между исследуемыми показателями и увеличением Т-стадии КРР, что может свидетельствовать о взаимосвязи этих белков с раз-

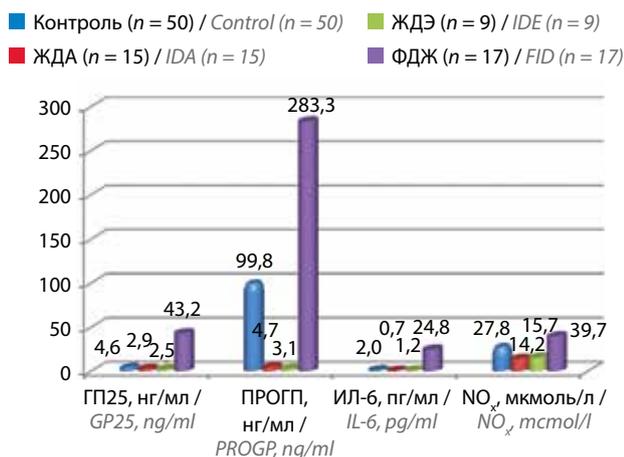


Рис. 1. Показатели гепсидина 25 (ГП25), прогепсидина (ПРОГП), интерлейкина 6 (ИЛ-6), оксида азота (NO_x) у больных колоректальным раком с разными типами анемического синдрома в сравнении с группой контроля без онкопатологии. ЖДА – железодефицитная анемия; ЖДЭ – железодефицитный эритропоэз; ФДЖ – функциональный дефицит железа

Fig. 1. Indicators of hepsidin 25 (GP25), prohepsidin (PROGP), interleukin 6 (IL-6), nitric oxide (NO_x) in patients with colorectal cancer and with different types of anemic syndrome compared with the control group without oncopathology. IDA – iron deficiency anemia; IDE – iron deficiency erythropoiesis; FID – functional iron deficiency

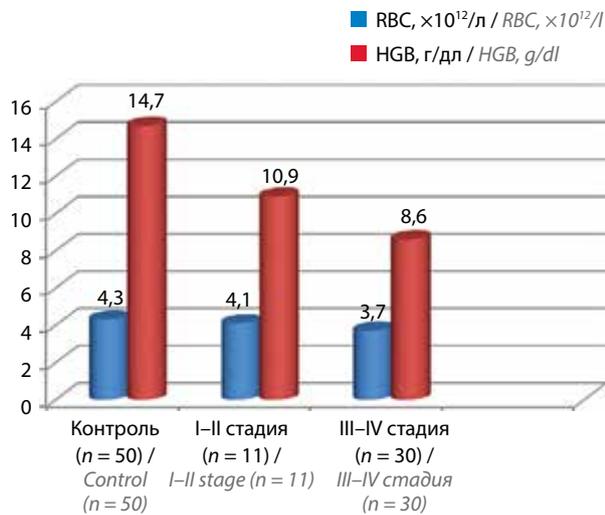


Рис. 2. Показатели количества эритроцитов (RBC) и уровня гемоглобина (HGB) в зависимости от стадии заболевания у больных колоректальным раком с анемическим синдромом

Fig. 2. Indicators of the number of erythrocytes (RBC) and hemoglobin (HGB) level depending on the stage of the disease in patients with colorectal cancer and anemic syndrome

витием цитокинуиндуцированной анемии онкологических больных. Полученные данные могут быть использованы для оценки состояния метаболических нарушений при анемиях, ассоциированных со злокачественными новообразованиями, для диффе-

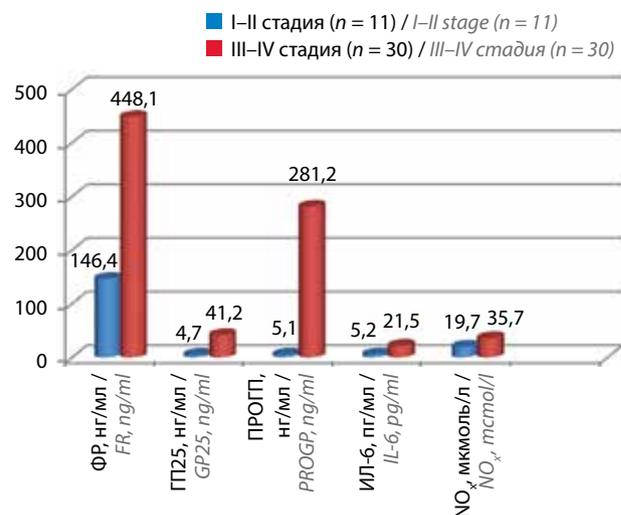


Рис. 3. Показатели ферритина (ФР), гепсидина 25 (ГП25), прогепсидина (ПРОГП), интерлейкина 6 (ИЛ-6), оксида азота (NO_x) в зависимости от стадии заболевания у больных колоректальным раком с анемическим синдромом

Fig. 3. Indicators of ferritin (FR), hepcidin 25 (GP25), prohepcidin (PROGP), interleukin-6 (IL-6), nitric oxide (NO_x) depending on the stage of the disease in patients with colorectal cancer and anemic syndrome

ренциальной диагностики вариантов АС и выбора адекватного лечения. Модуляция синтеза ГП25 и NO_x – возможная диагностическая и терапевтическая цель при КРР.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Aapro M., Beguin Y., Bokemeyer C. et al. Management of anemia and iron deficiency in patients with cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 2018;29(Suppl 4):iv96–iv110. DOI: 10.1093/annonc/mdy323
- Qianqian G., Liwen L., Shanshan H. et al. The role of iron in cancer progression. *Front Oncol* 2021;11:778492. DOI: 10.3389/fonc.2021.778492
- Nicolae C.D., Coman O.A., Ene C. et al. Heparin in neoplastic disease. *J Med Life* 2013;6(3):355–60.
- Brankovich B., Stanojevic G., Stoyanovich I. et al. Nitric oxide synthesis modulation – a possible diagnostic and therapeutic in patients with colorectal cancer. *J BUON* 2017;22(1):162–9.
- Голиков П.П., Николаева Н.Ю. Метод определения нитрита/нитрата (NO_x) в сыворотке крови. *Биомедицинская химия* 2004;50(1):79–85. Golikov P.P., Nikolaeva N.Yu. Method for determination of nitrite/nitrate (NO_x) in blood serum. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry* 2004;50(1):79–85. (In Russ.).
- Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови. *Клиническая лабораторная диагностика* 2005;6:15–8. Metelskaya V.A., Gumanova N.G. Screening method for determining the level of nitric oxide metabolites in serum. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics* 2005;6:15–8. (In Russ.).
- World Medical Association, Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA* 2013;310(20):2191–4. DOI:10.1001/jama.2013.281053
- Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3(9):710–20. DOI: 10.1038/nri1180
- Nemeth E., Ganz T. Role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol* 2009;122(2–3):78–86. DOI: 10.1159/000243791
- Charostad J., Azaran A., Nakhaei M. et al. Upregulation of interleukin-6 in HPV-positive breast cancer patients. *Iran J Immunol* 2021;18(4):315–30. DOI: 10.22034/IJI.2021.89107.1930
- Блиндарь В.Н., Добровольская М.М., Хагажеева М.Н. и др. Роль интерлейкина-6 и гепсидина-25 в патогенезе анемического синдрома, ассоциированного со злокачественными новообразованиями у онкологических больных раком молочной железы до неoadъювантной химиотерапии. *Клиническая лабораторная диагностика* 2021;66(3):147–53. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-3-147-153
- Blindar V.N., Dobrovolskaya M.M., Khagazheeva M.N. et al. The role of interleukin-6 and hepcidin-25 in the pathogenesis of anemic syndrome associated with malignant neoplasms in cancer patients with breast cancer before neoadjuvant chemotherapy. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics* 2021;66(3):147–53. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-3-147-153. (In Russ.).
- Зубрихина Г.Н., Блиндарь В.Н., Матвеева И.И. Дифференциальная диагностика анемического синдрома при истинном железодефицитном состоянии и функциональном дефиците железа у больных с хроническими заболеваниями (злокачественными новообразованиями). *Терапевтический архив* 2016;88(4):61–7. DOI: 10.17116/terarkh201688461-67

- Zubrikhina G.N., Blindar V.N., Matveeva I.I. Differential diagnosis of anemia in true and functional iron deficiency in patients with chronic diseases (malignant tumors). *Terapevticheskii arkhiv = Therapeutic Archive* 2016;88(4):61–7. (In Russ.). DOI: 10.17116/terarkh201688461-67
13. Bayhan Z., Şimşek T., Ergül E. et al. Serum cytokines level in patients with colorectal cancer according on tumor stages and VEGF gene polymorphism. *Hepatogastroenterology* 2014;61(135):1889–94.
14. Lee S., Song A., Eo W. Serum ferritin as a prognostic biomarker for survival in relapsed or refractory metastatic colorectal cancer. *J Cancer* 2016;7(8):957–64. DOI: 10.7150/jca.14797
15. Zhai K., Yang Y., Gao Z.G., Ding J. Interleukin-6-174G>C gene promoter polymorphism and prognosis in patients with cancer. *Oncotarget* 2017;8(27):44490–7. DOI: 10.18632/oncotarget.17771
16. Xiang-Tao P. Expression of hepcidin and neogenin in colorectal cancer. *Open Med* 2017;12:184–8. DOI: 10.18632/oncotarget.17771
17. Guo Q., Li L., Hou S. et al. The role of iron in cancer progression. *Front Oncol* 2021;11:778492. DOI: 10.3389/fonc.2021.778492

Вклад авторов

В.Н. Блиндарь, М.М. Добровольская: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных и публикаций по теме статьи, написание текста статьи;

Г.Н. Зубрихина, Т.В. Давыдова: критический пересмотр статьи с внесением ценного интеллектуального содержания.

Author's contributions

V.N. Blindar, M.M. Dobrovolskaya: development of research design, analysis of the data obtained and publications on the topic of the article, article writing;

G.N. Zubrikhina, T.V. Davydova: critical revision of the article with the introduction of valuable intellectual content.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.Н. Блиндарь / V.N. Blindar: <https://orcid.org/0000-0002-4630-4988>

М.М. Добровольская / M.M. Dobrovolskaya: <https://orcid.org/0000-0002-8889-5384>

Г.Н. Зубрихина / G.N. Zubrikhina: <https://orcid.org/0000-0002-5854-9755>

Т.В. Давыдова / T.V. Davydova: <https://orcid.org/0000-0002-5769-3114>

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: 07.11.2022. Принята к публикации: 13.02.2023.

Article received: 07.11.2022. Accepted for publication: 13.02.2023.

Нанозонды на основе флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов и однодоменных антител для высокочувствительной детекции рецептора эпидермального фактора роста в опухолевых клетках

Г.О. Нифонтова¹, Д.В. Калениченко¹, М.А. Барышникова², З.А. Соколова², П.С. Самохвалов³,
А.В. Караулов⁴, А.В. Суханова¹, И.Р. Набиев^{1,4}

¹Университет Реймса Шампань-Арденн; Франция, 51100 Реймс, ул. Когнак Жэ, 51;

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

³ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»; Россия, 115409 Москва, Каширское шоссе, 31;

⁴ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119992 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Игорь Руфаилович Набиев igor.nabiev@gmail.com

Введение. Разработка инновационных средств флуоресцентной визуализации, представляющих собой нанозонды – конъюгаты квантовых точек (КТ) и однодоменных антител (одАТ), специфически распознающих биомаркеры опухолей, в частности рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), является актуальным направлением усовершенствования подходов к иммуногистохимическому типированию опухолей.

Цель исследования – разработка флуоресцентных нанозондов на основе КТ и одАТ, специфически распознающих EGFR, а также оценка их функциональных характеристик (размера и оптических свойств) и функциональной активности.

Материалы и методы. КТ получены методом металлоорганического высокотемпературного синтеза и переведены в водную фазу посредством поэтапной замены лигандов на поверхности КТ. Ориентированную конъюгацию КТ и одАТ осуществляли с использованием бифункционального агента для кросс-сшивки. Полученные конъюгаты комплексно охарактеризованы методами динамического светорассеяния и иммуноанализа. Функциональную активность оценивали на модельной линии опухолевых клеток эпидермоидной карциномы А431.

Результаты. Разработанные конъюгаты стандартизованы по контрольным параметрам, обуславливающим их функциональную активность, в частности по гидродинамическому диаметру и эффективности связывания с опухолевыми клетками-мишенями, и характеризуются высокой дисперсностью, гомогенностью, специфической функциональной активностью по отношению к исследованной молекулярной мишени.

Заключение. Полученные результаты демонстрируют потенциальную возможность использования разработанных конъюгатов КТ и одАТ для детекции EGFR при иммуногистохимическом типировании опухолей.

Ключевые слова: квантовые точки, однодоменные антитела, конъюгация, нанозонды для флуоресцентной детекции, рецептор эпидермального фактора роста

Для цитирования: Нифонтова Г.О., Калениченко Д.В., Барышникова М.А. и др. Нанозонды на основе флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов и однодоменных антител для высокочувствительной детекции рецептора эпидермального фактора роста в опухолевых клетках. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(1):68–75. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-68-75

Nanoprobes based on fluorescent semiconductor nanocrystals and single-domain antibodies for highly sensitive detection of epidermal growth factor receptor in tumor cells

Galina O. Nifontova¹, Daria V. Kalenichenko¹, Maria A. Baryshnikova², Zinaida A. Sokolova², Pavel S. Samokhvalov³, Alexander V. Karaulov⁴, Alyona V. Sukhanova¹, Igor R. Nabiev^{1, 4}

¹University of Reims Champagne-Ardenne; 51 Cognacq Jay, 51100 Reims, France;

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

³National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), 31 Kashirskoe Shosse, 115409 Moscow, Russia;

⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University); Bld. 2, 8 Trubetskaya, 119992 Moscow, Russia

Contacts: Igor Rufailovich Nabiev igor.nabiev@gmail.com

Background. The development of highly oriented conjugates of quantum dots (QDs) and single-domain antibodies (sdAbs) as innovative fluorescence imaging nanoprobes that specifically recognize tumor biomarkers, in particular, epidermal growth factor receptor (EGFR), is a promising approach to improving immunohistochemical tumor typing.

Aim. The study was aimed at developing fluorescent nanoprobes based on QDs and sdAbs that specifically recognize EGFR, as well as evaluating their functional characteristics (size and optical properties) and functional activity.

Materials and methods. QDs were obtained using high-temperature organometallic synthesis and transferred into the aqueous phase by means of stepwise replacement of ligands on the QD surface. The QDs and sdAbs were conjugated in an oriented manner using a bifunctional cross-linking agent. Detailed characteristics of the resulting conjugates were analyzed by the dynamic light scattering and immunoassay methods. Functional activity was assessed on the model human epidermoid carcinoma cells line A431.

Results. The QD–sdAb conjugates have been standardized in terms of control parameters determining their functional activity, in particular, hydrodynamic diameter and efficiency of binding with target tumor cells. They are characterized by high dispersity, homogeneity, and specific functional activity towards their molecular target.

Conclusion. The results demonstrate the potential use of the designed QD–sdAb conjugates for EGFR detection in immunohistochemical typing of tumor.

Keywords: quantum dots, single-domain antibodies, conjugation, nanoprobes for fluorescent detection, epidermal growth factor receptor

For citation: Nifontova G.O., Kalenichenko D.V., Baryshnikova M.A. et al. Nanoprobes based on fluorescent semiconductor nanocrystals and single-domain antibodies for highly sensitive detection of epidermal growth factor receptor in tumor cells. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2023;22(1): 68–75. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-68-75

Введение

Ранняя диагностика опухолей является одним из факторов, обеспечивающих положительный прогноз и улучшение показателя выживаемости пациентов. Секвенирование единичных опухолевых клеток, многопараметрический анализ образцов аутопсии и жидкостной биопсии представляют собой современные диагностические инструменты персонализированной терапии опухолей [1]. Рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) является одним из клинически релевантных маркеров, поскольку экспрессируется различными опухолевыми клетками, в частности опухолями молочной железы [2], легкого [3, 4] и яичников [5]. Мониторинг экспрессии EGFR в образцах биоматериала и определение наличия его мутантных форм позволяют предсказать чувствительность опухолей к ингибиторам EGFR-тирозинкиназы, что также представляется актуальным при подборе эффективной стратегии противоопухолевой терапии [6].

Флуоресцентная детекция применяется для многопараметрического иммуногистохимического анализа [7], трехмерной визуализации (реконструкции) биологических тканей [8] и *in vivo* визуализации [9], биохимических исследований взаимодействий между макромолекулами [10]. Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы (квантовые точки, КТ) представляют собой перспективные нанометки, характеризующиеся высокой яркостью, фотостабильностью, широким спектром возбуждения и узким пиком флуоресценции, а также намного более высоким временем жизни флуоресценции и устойчивостью к фотовыгоранию, выгодно отличающимися их от органических флуоресцентных красителей [11, 12]. Для обеспечения возможности высокоспецифичной и высокочувствительной флуоресцентной детекции отдельных молекулярных маркеров органические флуорофоры или КТ конъюгируют с распознающими молекулами — полноразмерными антителами иммуноглобулинами класса G (IgG) или их фрагментами,

а также однодоменными антителами (одАТ). Малый физический размер одАТ (около 2 нм), их конформационная стабильность, устойчивость к высоким температурам и присутствию детергентов, гидрофильность и стабильность в буферных растворах, являются ключевыми критериями, обуславливающими их привлекательность как инструмента специфичной и высокочувствительной иммунодетекции [13–15].

Конъюгация распознающих молекул, в частности одАТ, с поверхностью КТ позволяет получать флуоресцентные нанозонды малого размера, что улучшает их проникновение в ткани, а также обеспечивает возможность связывания с эпитопами биомаркеров, которые недоступны для классических полноразмерных антител [16]. Кроме того, высокая стабильность одАТ позволяет проводить окрашивание и детекцию сигнала в более широком диапазоне физико-химических параметров образца, что дает возможность оптимизировать протоколы пермеабилзации, фиксации и окрашивания срезов опухолевых тканей. Таким образом, разработка новых средств флуоресцентной визуализации, представляющих собой конъюгаты КТ и одАТ, специфически распознающих биомаркеры опухолей, в частности EGFR, является актуальным направлением усовершенствования подходов к иммуногистохимическому типированию опухолей.

Цель исследования – разработка флуоресцентных нанозондов на основе КТ и одАТ, специфически распознающих EGFR, а также оценка их функциональных характеристик (размера и оптических свойств) и функциональной активности.

Материалы и методы

Материалы. Оксид кадмия (99,5 %), 2-этилгексановая кислота (99 %), олеиновая кислота (90 %), 1-октадецен (ОДЕ, 90 %), селен (порошок, 100 mesh, 99,5 %), оксид цинка (99–100 %), тиомочевина (>99 %), триглицерин (99 %), три-*n*-октилфосфин оксид (ТОФО, 99 %) приобретены у Sigma-Aldrich (США) и использованы без дополнительной очистки. Растворители – метанол, метилацетат, *n*-гексан марки «для спектроскопии» приобретены у АО «ЭКОС-1» (Россия). Реактивы для перевода КТ в водную фазу хлороформ и метанол марки «для спектроскопии», D,L-цистеин, гидроксид натрия получены от Sigma-Aldrich (США). Для солиubilизации водорастворимых КТ использовали производное полиэтиленгликоля (ПЭГ), содержащее концевые тиольную и гидроксильную группы, а также алифатический фрагмент длиной $(\text{CH}_2)_{11}(\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{EG}_6-\text{OH})$, полученный от Prochimia Surfaces (Польша). Трис(2-карбоксиил)фосфин гидрохлорид (ТФ), *N*-[*p*-малеимидофенил]изоцианат (МФИ) приобретены у Thermo Fischer Scientific (США). Все остальные используемые реагенты

были аналитического класса (приобретены у Sigma-Aldrich, США). Буферные растворы были приготовлены с использованием воды Milli-Q (18,2 мΩ·см), полученной с помощью системы очистки воды Direct-Q (Millipore, Франция), и дополнительно профильтрованы через стерильные фильтры с размером пор 0,22 мкм.

Рекомбинантные одАТ, специфически распознающие EGFR, и контрольный неспецифический анализ, содержащие на C-конце аминокислотной последовательности белковых молекул дополнительно введенный остаток цистеина, любезно предоставлены профессором Софи Эрно (Sophie Hernot, Vrije Universiteit Brussel, Бельгия). Клеточная линия эпидермоидной карциномы A431 была получена из Биоресурсной коллекции клеточных линий и первичных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Синтез 0,4 М прекурсора селена. В двугорлую колбу объемом 25 мл помещали 4 ммоль селена в форме порошка и 16 мл ОДЕ. В колбу устанавливали термopару и отвод, через который осуществляли вакуумирование и подачу аргона. Взвесь селена в ОДЕ начинали перемешивать на скорости 1000 об/мин и нагревать до 120 °С при вакуумировании (остаточное давление – 20 мбар). Дегазацию проводили в течение 25 мин, после чего проводили аккуратный нагрев реакционной смеси до 200 °С в токе аргона. Далее проводили перемешивание реакционной смеси до полного растворения селена с образованием раствора с интенсивной коричневой окраской (около 1,5 ч), после чего резко нагревали до 250 °С и выдерживали раствор при этой температуре в течение 30 мин. Далее раствор охлаждали в токе аргона до комнатной температуры и переносили его в стеклянную банку, где хранили до использования в синтезе. При необходимости перед проведением синтеза раствор прогревали до 110 °С при пропускании через него аргона.

Синтез квантовых точек CdSe/ZnS. В трехгорлую колбу объемом 50 мл помещали 1 ммоль оксида кадмия, 16 мл ОДЕ и 3,5 ммоль ОК. В колбу устанавливали термopару, отвод для вакуумирования и подвода аргона, а также отвод с прокальваемой силиконовой септой. Пропуская через реакционную смесь поток аргона, нагревали ее до 250 °С до полного растворения оксида кадмия с образованием раствора со слабой желтой окраской. Далее раствор охлаждали до 120 °С и проводили дегазацию в течение 25 мин. Затем в токе аргона раствор прекурсора кадмия резко нагревали до 270 °С, и при скорости перемешивания 950 об/мин осуществляли резкий впрыск 4 мл прекурсора селена. После впрыска температуру реакционной смеси снижали до 250 °С, и в течение 5 мин проводили реакцию синтеза ядер CdSe. Далее реакционную смесь охлаждали

до 50 °С потоком холодного воздуха, добавляли в колбу 20 мл метанола и перемешивали образовавшуюся эмульсию в течение 20 мин. Далее эмульсии давали отстояться, после чего собирали верхний слой, содержащий остатки прекурсора кадмия. Процедуру обработки ядер CdSe метанолом проводили еще 2 раза, затем удаляли остатки метанола вакуумированием при слабом нагреве, после чего смесь повторно дегазировали при 100 °С в течение 20 мин. Затем смесь быстро нагревали до 180 °С, после чего в течение 1 ч в раствор вводили 5 мл 0,62 М раствора 2-этилгексаноата цинка в ОДЕ и 3 мл 0,8 М раствора тиомочевины в триглице. По окончании ввода прекурсоров оболочку реакционную смесь выдерживали при 180 °С в течение 20 мин, после чего реактор охлаждали до 50 °С и проводили выделение КТ CdSe/ZnS посредством их осаждения избытком метилацетата и центрифугирования. Очищенные КТ растворяли в н-гексане, добавляли в раствор 250 мг ТОФО и высушивали в кристаллизаторе.

Получение водорастворимых квантовых точек CdSe/ZnS. Предварительно осуществляли очистку синтезированных КТ от ТОФО методом растворения-преципитации в смеси хлороформа и метанола, как описано ранее [17, 18]. Отмывку и переосаждение повторяли 2 раза, затем растворяли осадок в 800 мкл хлороформа. Полученные образцы КТ в хлороформе титровали раствором DL-цистеина (10 мг/мл) в метаноле до получения хлопьеобразного осадка. Цистенированные КТ осаждали центрифугированием при 14 000 об/мин, полученный осадок трижды промывали метанолом, чтобы удалить непрореагировавший избыток цистеина, и высушивали под вакуумом. Полученный осадок КТ высушивали в вакуум-концентраторе при комнатной температуре в течение 2 мин. К высушенному остатку КТ добавляли 600 мкл воды ультрачистой и 60 мкл 1 М раствора гидроксида натрия. Образец перемешивали на вортексе и озвучивали с помощью ультразвуковой бани в течение 10 мин. Подготовленный таким образом образец КТ центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 8000 об/мин при комнатной температуре. Полученный супернатант, содержащий КТ в водной фазе аккуратно отбирали и фильтровали через фильтры Millipore с диаметром отверстий 0,22 мкм. Затем в водному раствору КТ добавляли производное ПЭГ с химической структурой HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OH, при этом рабочее массовое соотношение производное ПЭГ:КТ составляло 30 мг: 8,7 мг. Полученный образец интенсивно перемешивали и инкубировали при +4 °С в течение 48 ч в темноте. После инкубации солюбилизированные КТ очищали от избытка лигандов и переводили в 0,05 М натрий-фосфатный буфер (рН 7,2) с помощью ультрацентрифугирования с использованием центрифужных фильтров Amicon 15 Ultra 10K и центрифужных гель-фильтрационных колонок, заполненных

носителем Сефадекс-G25. Полученный препарат фильтровали с использованием стерильных фильтров с диаметром пор 0,1 мкм.

Получение мономерной формы однодоменных антител. Мономеры молекул одАТ анти-EGFR получали путем восстановления дисульфидных связей с использованием ТФ. Для проведения редукции образцы одАТ инкубировали с 10-кратным молярным избытком ТФ при комнатной температуре при мягком перемешивании в течение 30 мин. После проведения реакции восстановления полученные образцы мономеров одАТ переводили в буфер для проведения реакции конъюгирования с КТ (0,05 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,0) с помощью центрифужных гель-фильтрационных колонок, заполненных носителем Сефадекс-G25 и уравновешенных 0,05 М натрий-фосфатным буфером (рН 7,0).

Получение конъюгатов квантовых точек и однодоменных антител. КТ переводили в буфер для проведения реакции активации поверхности (0,05 М боратный буфер, рН 8,5) с помощью центрифужных гель-фильтрационных колонок, заполненных носителем Сефадекс-G25. Образец КТ с концентрацией 0,5 мг/мл смешивали с аликвотами стокового раствора МФИ до получения молярного соотношения МФИ:КТ – 50:1. После инкубации в темноте в течение 45 мин при комнатной температуре и постоянном мягком встряхивании малеимид-активированные КТ переводили в буфер для проведения реакции ковалентного связывания с одАТ (0,05 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,0) с помощью гель-фильтрационных колонок, заполненных носителем Сефадекс-G25. Подготовленные малеимид-активированные КТ смешивали с восстановленными образцами одАТ анти-EGFR или контрольных одАТ (молярное соотношение одАТ:КТ-МФИ – 10:1), инкубировали реакционную смесь в темноте в течение 2 ч при комнатной температуре и постоянном мягком встряхивании и проводили очистку с помощью колоночной хроматографии на гель-фильтрационной колонке, заполненной носителем Сефадекс-G100.

Характеризация квантовых точек и их конъюгатов с однодоменными антителами. Оценку оптических свойств водорастворимых КТ осуществляли с помощью спектрофотометра Cary 60 и спектрофлуориметра Cary Eclipse (Agilent Technologies, США). Размер КТ и их конъюгатов с одАТ анти-EGFR оценивали методом динамического светорассеяния с помощью прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern Pananalytical, Великобритания).

Оценка функциональной активности конъюгатов квантовых точек и однодоменных антител. Для характеристики функциональной активности полученных конъюгатов применяли анализ с помощью метода иммунодетекции in-cell-иммуноферментный анализ

с использованием модельных опухолевых клеток, экспрессирующих молекулярную мишень – EGFR. Клетки эпидермоидной карциномы человека A431 высаживали в 96-луночный планшет из черного пластика с оптически прозрачным дном и полилизинированной поверхностью лунок и доращивали в стандартных условиях до достижения плотности клеточного монослоя 80–90 %. Перед проведением анализа культуральную среду, в которой культивировались клетки, аккуратно отбирали без повреждения клеточного монослоя. В лунки планшета добавляли 100 мкл 4 % раствора параформальдегида в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) и инкубировали при мягком перемешивании в течение 15 мин при комнатной температуре. После инкубации содержимое лунок аккуратно отбирали. Фиксированные клетки в лунках 3-кратно отмывали фосфатно-солевым буфером (рН 7,4). После отмывки проводили блокировку поверхности лунок 3 % раствором казеина в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4). В лунки вносили 300 мкл блокирующего раствора, планшет инкубировали в течение 2 ч при мягком перемешивании при комнатной температуре. Затем блокирующий раствор удаляли из лунок и вносили исследуемые разведения конъюгатов КТ с одАТ анти-EGFR или контрольными одАТ, или контрольный буферный раствор (фосфатно-солевой буфер, рН 7,4) в объеме 100 мкл/лунку в триплетах. После инкубации содержимое лунок планшета аккуратно отбирали и 3-кратно отмывали, добавляя в лунки 300 мкл 0,05 % раствора Tween-20 в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4). После финальной отмывки в лунки добавляли 300 мкл фосфатно-солевого буфера (рН 7,4) и измеряли интенсивность флуоресценции в лунках при длине волны возбуждения 488 нм и длине волны испускания 592 нм с помощью планшетного ридера Infinite 200 PRO (Tecan, Швейцария). Дополнительно эффективность связывания полученных флуоресцентных нанозондов с модельными клетками оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием микроскопа Axio Observer 3 (Carl Zeiss, Германия).

Результаты

Иммуногистохимическое типирование опухолевых срезов проводится в водной среде или буферных растворах, характеризующихся определенными значениями рН и ионной силы [16]. После синтеза КТ нерастворимы в воде и содержат на своей поверхности большое количество ТОФО, защищающего КТ от окисления. Однако наличие органической оболочки на поверхности КТ является препятствием для взаимодействия гидрофильных лигандов с поверхностью КТ. Для получения стабильных водорастворимых КТ, характеризующихся отсутствием агрегатов, нами был использован подход поэтапной замены лигандов на

поверхности КТ. Для перевода КТ в водную фазу на 1-м этапе с поверхности КТ был полностью удален органический лиганд (ТОФО), и поверхность КТ хелатирована лигандом, содержащим гидрофильные группы, совместимые с водными растворами (D,L-цистеин). Затем для дальнейшего получения конъюгатов поверхность КТ, переведенных в водную фазу, была стабилизирована посредством добавления производного ПЭГ, содержащего концевые тиольную и гидроксильные функциональные группы, необходимые для обеспечения коллоидной стабильности и последующей конъюгации КТ с одАТ соответственно. Полученные водорастворимые КТ, стабилизированные с помощью HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OH, характеризуются широким спектром поглощения и узким спектром флуоресценции с положением максимума флуоресценции, соответствующим 592 нм (рис. 1, а, б). Показано, что солиобилизованные КТ обладают узким распределением гидродинамического диаметра и отсутствием крупноразмерных агрегатов (рис. 1, в). Средний размер (гидродинамический диаметр) полученных водорастворимых КТ составляет 7,5 ± 0,6 нм. Заряд поверхности полученных КТ составляет -9,4 ± 3,9 мВ, что свидетельствует об эффективной модификации их поверхности с помощью выбранного лиганда. Слабоотрицательный заряд поверхности КТ в водной среде подтверждает наличие на поверхности КТ экспонированных гидроксильных групп, необходимых для проведения конъюгации с одАТ.

Ориентированные конъюгаты одАТ и КТ получены путем химического ковалентного связывания сульфгидрильной группы остатка цистеина молекул одАТ и экспонированных в раствор гидроксильных групп КТ. Для этого предварительно проводили восстановление одАТ с целью обеспечения отсутствия в образцах одАТ их димерных форм вследствие образования дисульфидной связи между двумя сульфгидрил-содержащими молекулами одАТ в процессе хранения.

Для проведения реакции химического ковалентного связывания одАТ с поверхностью КТ использовали бифункциональный агент для кросс-сшивки сульфгидрильных и гидроксильных групп МФИ, совместимый с составом реакционной смеси. Для проведения реакции конъюгации осуществляли малеимидную активацию поверхности КТ. МФИ содержит в своей структуре малеимидную группу, способную реагировать с экспонированной сульфгидрильной группой одАТ, а также изоцианатную группу, реактогенную по отношению к гидроксильным группам на поверхности КТ, модифицированных производным ПЭГ [17].

Размер конъюгатов является одним из критических параметров контроля эффективности проведенной конъюгации. Размер нанозондов определяет

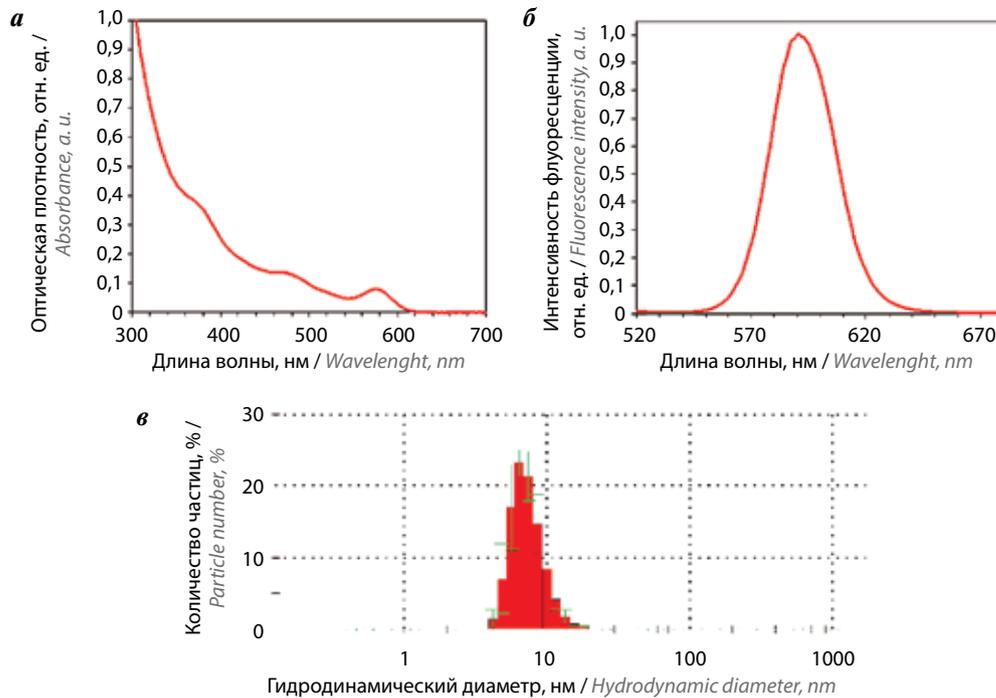


Рис. 1. Результаты характеристики водорастворимых квантовых точек CdSe/ZnS, солюбилизованных с помощью производного полиэтиленгликоля: спектр поглощения (а), спектр флуоресценции (б), распределение гидродинамического диаметра (в) полученных образцов

Fig. 1. Characteristics of the prepared samples of water-soluble CdSe/ZnS quantum dots solubilized with a polyethylene glycol derivative: the absorption spectrum (a), the fluorescence spectrum (b), and the distribution of the hydrodynamic diameter (c)

проникающую способность и, соответственно, эффективность и чувствительность детекции целевых биомаркеров [19]. Полученные конъюгаты характеризовались узким распределением по размерам и отсутствием крупноразмерных агрегатов (рис. 2). При этом средний гидродинамический диаметр конъюгатов КТ – анти-EGFR одАТ составляет $9,8 \pm 0,8$ нм. Средний размер контрольного образца конъюгата КТ – контрольное одАТ составляет $9,9 \pm 0,3$ нм.

Прирост среднего гидродинамического диаметра полученных конъюгатов по сравнению с таковым у исходных КТ, использованных для конъюгации, составляет 2,3–2,4 нм, что сопоставимо с размером молекул одАТ и свидетельствует о химическом связывании оптимального количества молекул одАТ в ориентированной конфигурации для сохранения эффективной функциональной активности полученных образцов конъюгатов. Полученные данные указывают на то, что используемые молярные соотношения МФИ:КТ – 50:1 и одАТ:КТ – 10:1 являются оптимальными для получения гомогенных конъюгатов КТ с высокой дисперсностью.

Функциональную активность полученных конъюгатов оценивали с помощью in-cell-иммуоферментного анализа с использованием модельной клеточной линии эпидермоидной карциномы человека А431, экспрессирующей EGFR. Полученные результаты представлены на рис. 3, 4. Для изучаемых конъюгатов

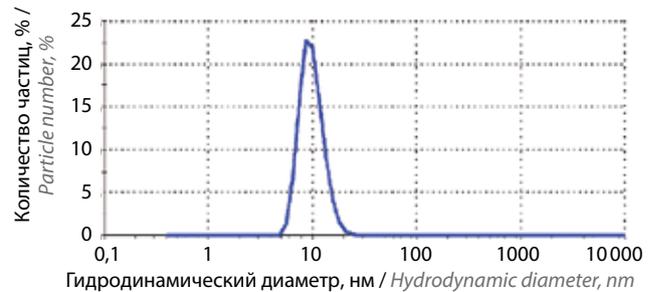


Рис. 2. Распределение гидродинамического диаметра конъюгатов квантовых точек и однодоменных антител анти-EGFR

Fig. 2. Distribution of the hydrodynamic diameter of the conjugates of anti-EGFR single-domain antibodies with quantum dots

КТ – анти-EGFR одАТ характерно наличие специфического связывания с модельными клетками линии А431, начиная с разведения 1:500. Наиболее выраженный детектируемый сигнал наблюдается в случае разведений 1:100, 1:50 и 1:25. При этом связывание контрольных образцов – КТ, не конъюгированных с одАТ, и конъюгата КТ – контрольное одАТ – имеет слабовыраженный характер, близкий к фоновому сигналу, что указывает на специфическое взаимодействие конъюгатов КТ – анти-EGFR одАТ с модельными опухолевыми клетками. Таким образом, разработанные конъюгаты были стандартизованы по контрольным параметрам, обуславливающим их функциональную активность, в частности по

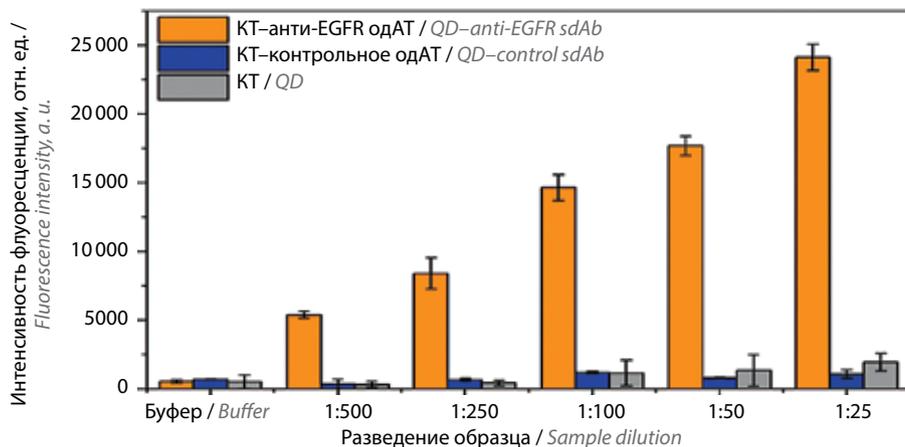


Рис. 3. Профили связывания полученных образцов конъюгатов квантовых точек с однодоменными антителами анти-EGFR (КТ–анти-EGFR одАТ), квантовых точек с контрольными однодоменными антителами (КТ–контрольное одАТ) и квантовых точек, не конъюгированных с однодоменными антителами (КТ), с модельными клетками эпидермоидной карциномы человека A431

Fig. 3. The profiles of binding of the model A431 human epidermoid carcinoma cells with the conjugates of quantum dots and anti-EGFR single-domain antibodies (QD–anti-EGFR sdAb), conjugates of quantum dots and control single-domain antibodies (QD–control sdAb), and quantum dots not conjugated with antibodies (QD)

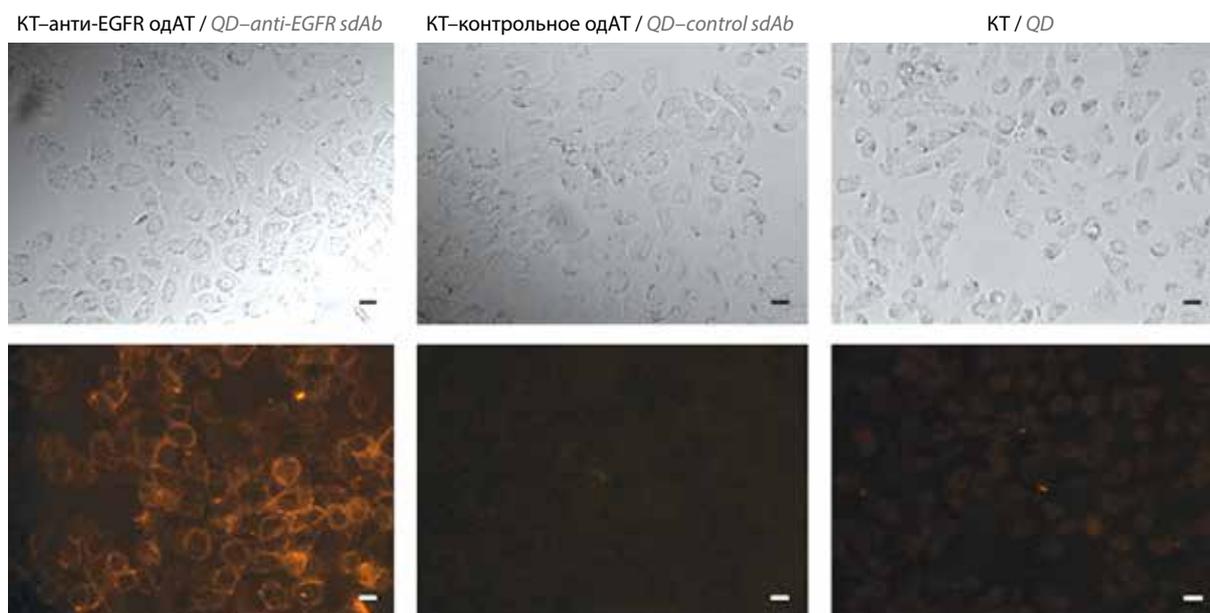


Рис. 4. Изображения клеток эпидермоидной карциномы человека A431, обработанных конъюгатами квантовых точек с однодоменными антителами анти-EGFR (КТ–анти-EGFR одАТ), квантовых точек с контрольными однодоменными антителами (КТ–контрольное одАТ) и неконъюгированных квантовых точек (КТ). Верхняя панель представляет собой снимки, полученные в светлом поле, нижняя панель – флуоресцентные изображения той же зоны (фильтр E506LP). Шкала, представленная на всех изображениях, соответствует 20 мкм

Fig. 4. Images of A431 human epidermoid carcinoma cells treated with the conjugates of quantum dots and anti-EGFR single-domain antibodies (QD–anti-EGFR sdAb), conjugates of quantum dots and control single-domain antibodies (QD–control sdAb), and quantum dots not conjugated with antibodies (QD). The top panel shows images obtained in the brightfield; the bottom panel shows fluorescence images of the same area (an E506LP filter). Scale bars, 20 μm

гидродинамическому диаметру и эффективности связывания с опухолевыми клетками-мишенями.

Заключение

Разработанные конъюгаты КТ и анти-EGFR одАТ характеризуются высокой дисперсностью, гомогенностью и функциональной активностью в отношении

заданной молекулярной мишени, подтвержденной методами иммуноанализа с использованием модельных опухолевых клеток, экспрессирующих EGFR. Полученные результаты демонстрируют возможность дальнейшего использования разработанных конъюгатов в качестве средства иммуногистохимического типирования биоптатов опухолей.

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

- Dagogo-Jack I., Shaw A. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol* 2018;15(2):81–94. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.166
- Gupta G.K., Collier A.L., Lee D. et al. Perspectives on triple-negative breast cancer: current treatment strategies, unmet needs, and potential targets for future therapies. *Cancers* 2020;12(9):2392. DOI: 10.3390/cancers12092392
- Sheikine Y., Rangachari D., McDonald D.C. et al. EGFR testing in advanced non-small-cell lung cancer, a mini-review. *Clin Lung Cancer* 2016;17(6):483–92. DOI: 10.1016/j.clcc.2016.05.016
- Inamura K. Update on immunohistochemistry for the diagnosis of lung cancer. *Cancers* 2018;10(3):72. DOI: 10.3390/cancers10030072
- Mehner C., Oberg A.L., Goergen K.M. et al. EGFR as a prognostic biomarker and therapeutic target in ovarian cancer: evaluation of patient cohort and literature review. *Genes Cancer* 2017;8(5–6):589–99. DOI: 10.18632/genesandcancer.142
- Fenizia F., De Luca A., Pasquale R. et al. EGFR mutations in lung cancer: from tissue testing to liquid biopsy. *Future Oncol* 2015;11(11):1611–23. DOI: 10.2217/fon.15.23
- Zhang W., Hubbard A., Jones T. et al. Fully automated 5-plex fluorescent immunohistochemistry with tyramide signal amplification and same species antibodies. *Lab Invest* 2017;97(7):873–85. DOI: 10.1038/labinvest.2017.37
- Wan H., Yue J., Zhu S. et al. A bright organic NIR-II nanofluorophore for three-dimensional imaging into biological tissues. *Nat Commun* 2018;9(1):1171. DOI: 10.1038/s41467-018-03505-4
- Montecinos-Franjola F., Lin J.Y., Rodriguez E.A. Fluorescent proteins for *in vivo* imaging, where's the biliverdin? *Biochem Soc Trans* 2020;48(6):2657–67. DOI: 10.1042/BST20200444
- Deshayes S., Divita G. Fluorescence technologies for monitoring interactions between biological molecules *in vitro*. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013;113:109–43. DOI: 10.1016/B978-0-12-386932-6.00004-1
- Bilan R., Nabiev I., Sukhanova A. Quantum dot-based nanotools for bioimaging, diagnostics, and drug delivery. *ChemBiochem* 2016;17(22):2103–114. DOI: 10.1002/cbic.201600357
- Nifontova G., Krivenkov V., Zvaigzne M. et al. Controlling charge transfer from quantum dots to polyelectrolyte layers extends prospective applications of magneto-optical microcapsules. *ACS Appl Mater Interfaces* 2020;12(32):35882–94. DOI: 10.1021/acsami.0c08715
- Dumoulin M., Conrath K., Van Meirhaeghe A. et al. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci* 2002;11(3):500–15. DOI: 10.1110/ps.34602
- Staus D.P., Winkler L.M., Strachan R.T. et al. Regulation of β_2 -adrenergic receptor function by conformationally selective single-domain intrabodies. *Mol Pharmacol* 2014;85(3):472–81. DOI: 10.1124/mol.113.089516
- Liu J.L., Goldman E.R., Zabetakis D. et al. Enhanced production of a single domain antibody with an engineered stabilizing extra disulfide bond. *Microbial Cell Factories* 2015;14(1):158. DOI: 10.1186/s12934-015-0340-3
- Ramos-Gomes F., Bode J., Sukhanova A. et al. Single- and two-photon imaging of human micrometastases and disseminated tumour cells with conjugates of nanobodies and quantum dots. *Sci Rep* 2018;8(1):4595. DOI: 10.1038/s41598-018-22973-8
- Brazhnik K., Nabiev I., Sukhanova A. Oriented conjugation of single-domain antibodies and quantum dots. In: *Quantum Dots: Applications in Biology*. Methods in Molecular Biology. N.-Y.: 2014. P. 129–140.
- Sukhanova A., Ramos-Gomes F., Chames P. et al. Multiphoton deep-tissue imaging of micrometastases and disseminated cancer cells using conjugates of quantum dots and single-domain antibodies. In: *Multiplexed Imaging*. Methods in Molecular Biology. N.-Y.: 2021. P. 105–123.
- Dang X., Bardhan N.M., Qi J. et al. Deep-tissue optical imaging of near cellular-sized features. *SciRep* 2019;9(1):3873. DOI: 10.1038/s41598-019-39502-w

Вклад авторов

Г.О. Нифонтова, Д.В. Калениченко, М.А. Барышникова, З.А. Соколова, П.С. Самохвалов: получение экспериментальных данных, обработка данных, подготовка рукописи;

А.В. Караулов, А.В. Суханова: анализ и интерпретация данных, редактирование рукописи;

И.Р. Набиев: концепция и дизайн, анализ и интерпретация данных, редактирование рукописи.

Author's contributions

G.O. Nifontova, D.V. Kalenichenko, M.A. Baryshnikova, Z.A. Sokolova, P.S. Samokhvalov: obtaining experimental data for analysis, data processing, article preparation;

A.V. Karaulov, A.V. Sukhanova: data analysis and interpretation, editing of the article;

I.R. Nabiev: concept and design, data analysis and interpretation, editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

Г.О. Нифонтова / G.O. Nifontova: <https://orcid.org/0000-0002-6956-5654>

Д.В. Калениченко / D.V. Kalenichenko: <https://orcid.org/0000-0002-1394-7768>

М.А. Барышникова / M.A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>

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

П.С. Самохвалов / P.S. Samokhvalov: <https://orcid.org/0000-0002-2878-8376>

А.В. Караулов / A.V. Karaulov: <https://orcid.org/0000-0002-1930-5424>

А.В. Суханова / A.V. Sukhanova: <https://orcid.org/0000-0003-2796-7898>

И.Р. Набиев / I.R. Nabiev: <https://orcid.org/0000-0002-8391-040X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Данная работа была поддержана грантом № 075-15-2021-937 (проект NanoToBio) Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Funding. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation through the grant No 075-15-2021-937 (NanoToBio project).

Статья поступила: 24.10.2022. **Принята к публикации:** 28.12.2022.

Article received: 24.10.2022. **Accepted for publication:** 28.12.2022.

Фармацевтическая разработка для трансдермальных лекарственных форм нифедипина: обоснование выбора и специфичность действия

В. В. Токаев¹, Э. Ф. Степанова¹, М. С. Макиева², Ю. А. Морозов², Д. И. Поздняков¹, Д. И. Гаглоева²

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 357532 Пятигорск, пр-кт Калинина, 11;

²ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет им. К. Л. Хетагурова»; Россия, 362025 Республика Северная Осетия – Алания, Владикавказ, ул. Ватутина, 44–46

Контакты: Элеонора Федоровна Степанова efstepanova@yandex.ru

Введение. Сегодняшний день в медицине можно охарактеризовать как активный период борьбы с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Эту группу болезней нельзя считать «устаревшей», и даже с учетом возникшей новой патологии – коронавирусной инфекции – сердечно-сосудистые заболевания упрочили свое доминирующее положение. Среди лекарственных средств, используемых для соответствующей фармакотерапии, выделяется нифедипин (1,4-дигидро-2,6-диметил-4-(2-нитрофенил)-3,5-пиридиндикарбоновой кислоты диметилловый эфир) – лекарственный препарат, способный тормозить поступление кальция в кардиомиоциты клеток гладкой мускулатуры сосудов. Препарат довольно давно присутствует на отечественном фармацевтическом рынке, но по-прежнему востребован. Однако нифедипин имеет достаточно выраженные побочные эффекты, в том числе связанные с его пероральным приемом, – тошнота, вызванная раздражением желудочно-кишечного тракта, редко – гиперплазия десен. В то же время основная современная лекарственная форма нифедипина – таблетки. Соответственно, расширение ассортимента лекарственных форм этого препарата – вопрос насущный, тем более что удачно подобранные лекарственные формы снижают вероятность развития побочных эффектов лекарственного средства (что особенно важно в случае пролонгированных вариантов). Таким образом, фармацевтическая разработка оригинальных лекарственных форм нифедипина вполне целесообразна.

Цель исследования – определение возможности всасывания нифедипина из предложенных лекарственных форм – трансдермального пластыря и трансдермального геля.

Материалы и методы. Для определения нифедипина в образцах плазмы крови крыс использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию (хроматограф «Милихром А-02» производства ООО Институт хроматографии «ЭкоНова», Россия).

Результаты. На хроматограммах образцов плазмы крови всех животных, на кожу которых наносили трансдермальный гель или пластырь, обнаружен пик, совпадающий по времени удерживания с пиком стандартного образца нифедипина.

Заключение. Подтверждена возможность проникновения нифедипина через неповрежденную кожу животных.

Ключевые слова: трансдермальные лекарственные формы, нифедипин, высокоэффективная жидкостная хроматография

Для цитирования: Токаев В. В., Степанова Э. Ф., Макиева М. С. и др. Фармацевтическая разработка для трансдермальных лекарственных форм нифедипина: обоснование выбора и специфичность действия. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(1):76–81. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-76-81

Pharmaceutical development for transdermal dosage forms of nifedipine: justification of the choice and specificity of the action

Vadim V. Tokaev¹, Eleonora F. Stepanova¹, Marina S. Makieva², Yuri A. Morozov², Dmitry I. Pozdnyakov², Diana I. Gagloeva²

¹Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – Branch of the Volga State Medical University of the Ministry of Health of Russia; 11 Kalinina Ave., 357532 Pyatigorsk, Russia;

²K.L. Khetagurov North Ossetian State University; 44–46 Vatutina St., Vladikavkaz 362025, Republic of North Ossetia – Alania, Russia

Contacts: Eleonora Fedorovna Stepanova efstepanova@yandex.ru

Background. Present day in medicine can be assessed as an active period of the fight against cardiovascular diseases. This group of diseases cannot be considered obsolete in any way, and even taking into account the emerging new pathology – coronavirus infection – cardiovascular diseases have consolidated their dominant position. Among the drugs used for appropriate pharmacotherapy, stands out nifedipine (1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)-3,5-pyridindicarboxylic acid dimethyl ether) – a drug that can inhibit the flow of calcium into the cardiomyocytes of vascular smooth muscle cells. The drug has been on the domestic pharmaceutical market for quite a long time, but it is still in demand. However, nifedipine has quite pronounced side effects, including those associated with its oral administration – nausea caused by irritation of the gastrointestinal tract, rarely gum hyperplasia. And at the same time, the main modern dosage form of nifedipine is tablets. Therefore, expanding the range of its dosage forms is an urgent issue. Moreover, well-chosen dosage forms reduce the side effect of the drug. This is especially true for extended versions. So pharmaceutical development in relation to the creation of original dosage forms of nifedipine is quite appropriate.

Aim. Determination of the possibility of absorption of nifedipine from the proposed dosage forms – transdermal patch and transdermal gel.

Materials and methods. To determine nifedipine in rat blood plasma samples, high-performance liquid chromatography was used (chromatograph “Millichrome A-02” (Institute of Chromatography “EcoNova”, LLC, Russia).

Results. Chromatograms of blood plasma samples of all animals on whose skin a transdermal gel or patch was applied revealed a peak coinciding in retention time with the peak of the standard sample of nifedipine.

Conclusion. The possibility of penetration of nifedipine from the patch and transdermal gel through intact animal skin has been confirmed.

Keywords: transdermal dosage forms, nifedipine, high-performance liquid chromatography

For citation: Tokaev V.V., Stepanova E.F., Makieva M.S. et al. Pharmaceutical development for transdermal dosage forms of nifedipine: justification of the choice and specificity of the action. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(1):76–81. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-76-81.

Введение

Одна из центральных задач современной фармацевтической технологии – создание оригинальных лекарственных форм с высокой терапевтической активностью, способных обеспечить контролируемое высвобождение лекарственных средств и их направленную доставку к месту патологического процесса [1]. Это чрезвычайно важно, так как существуют группы серьезных хронических заболеваний, для преодоления которых следует учитывать не только действие самого лекарственного средства, но и способ его доставки в организм. К таким заболеваниям относятся, прежде всего, сердечно-сосудистые патологии, считающиеся одними из самых распространенных в мире [2]. Главная их особенность – многопрофильность: к ним принадлежат и ишемия, и инфаркт миокарда, и артериальная гипертензия, и приступы мигрени [3]. Соответственно, и фармакотерапия этих заболеваний также весьма диапозонна: обеспечивающие ее лекарственные препараты находятся в рамках 15 фармакологических групп [4]. Пандемия COVID-19 2019–2022 гг. лишь усилила проявление сердечно-сосудистых патологий и расширила перечень этих болезней. Поэтому интерес к фармакотерапии сердечно-сосудистых заболеваний резко возрос, и это касается не только лекарственных субстанций, но и их лекар-

ственных форм, в том числе и ряда вопросов технологического совершенствования [5].

Одним из значимых объектов, используемых при лечении сердечно-сосудистых заболеваний, является нифедипин – 1,4-дигидро-2,6-диметил-4-(2-нитрофенил)-3,5-пиридиндикарбоновой кислоты диметилэфир (рис. 1).

Нифедипин обладает выраженным антигипертензивным эффектом, применяется также при бронхообструктивном синдроме, уменьшает периферическое

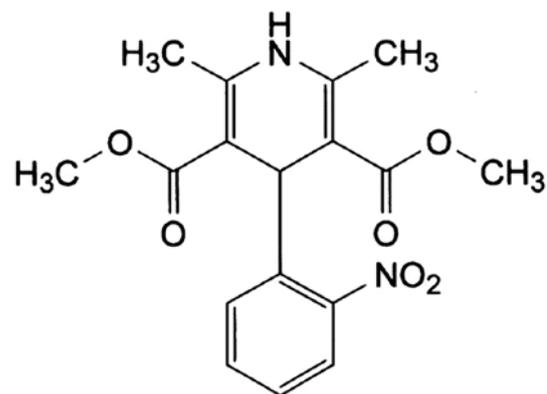


Рис. 1. Структурная формула нифедипина

Fig. 1. Structural formula of nifedipine

сопротивление сосудов, т. е. имеет достаточно широкий фармакологический спектр [6]. Однако при его пероральном приеме наблюдаются некоторые нежелательные побочные эффекты, которые могут быть нивелированы при использовании трансдермально-го пути введения лекарственного средства [7].

Цель исследования – определение возможности всасывания нифедипина из предложенных лекарственных форм – трансдермального пластыря и трансдермального геля.

Материалы и методы

Для подтверждения всасывания нифедипина из трансдермального пластыря и трансдермального геля образцы исследуемых лекарственных форм наносили на неповрежденную кожу лабораторных крыс. Через 6 ч проводили отбор крови из хвостовой вены, осаждали центрифугированием (при 1000 об/мин в течение 15 мин) форменные элементы, декантировали плазму и регистрировали нифедипин методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [3]. Параллельно исследовали плазму крови интактных животных.

Методика. К 500 мкл исследуемой плазмы прибавляли 700 мкл ацетонитрила сорта «для ВЭЖХ» (ГК «Экрос», Россия), встряхивали в течение 30 с и центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 14 500 об/мин на лабораторной центрифуге ПЭ-6900 (ООО «ТрубоСнаб», Россия).

Надосадочную жидкость переносили в виалы, которые помещали в автосамплер хроматографа «Милихром А-02» (ООО Институт хроматографии «Эко-Нова», Россия) со спектрофотометрическим детектором [8].

В качестве неподвижной фазы использовали октадецилсиликагель (колонка ProntoSIL-120-5-C18 2,0 × 75 мм с размером частиц 5 мкм) (ООО Институт хроматографии «ЭкоНова», Россия) [5]. Подвижная

Режим элюирования образцов

Sample elution mode

Время анализа, мин Analysis time, min	Объемная доля элюента В, % Volume fraction of the eluent В, %
2,5	30
4,0	45
8,5	50
12,0	90
15,0	30
20,0	30

фаза состояла из элюента А – 0,1 % водного раствора муравьиной кислоты и элюента В – 0,1 % раствора муравьиной кислоты (PanReac, Испания) в метаноле сорта «для ВЭЖХ» (ГК «Экрос», Россия). Хроматографическое разделение проводили в градиентном режиме элюирования (см. таблицу) при температуре колонки 35 °С и скорости подачи элюента 0,2 мл/мин, детектирование проводили при длине волны 235 нм [4, 9]. Объем вводимой пробы – 2 мкл.

Параллельно хроматографировали раствор стандартного образца, приготовленный следующим образом: 10,00 мг нифедипина (стандарт EP N0750000 Нифедипин CRS с содержанием нифедипина 99,8 %) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл метанола, встряхивали, доводили объем раствора до метки тем же растворителем, перемешивали и фильтровали через мембранный фильтр марки PRECLEANTM с диаметром пор 0,45 мкм (ООО Институт хроматографии «ЭкоНова», Россия) [10].

Проверка пригодности хроматографической системы показала ее соответствие установленным

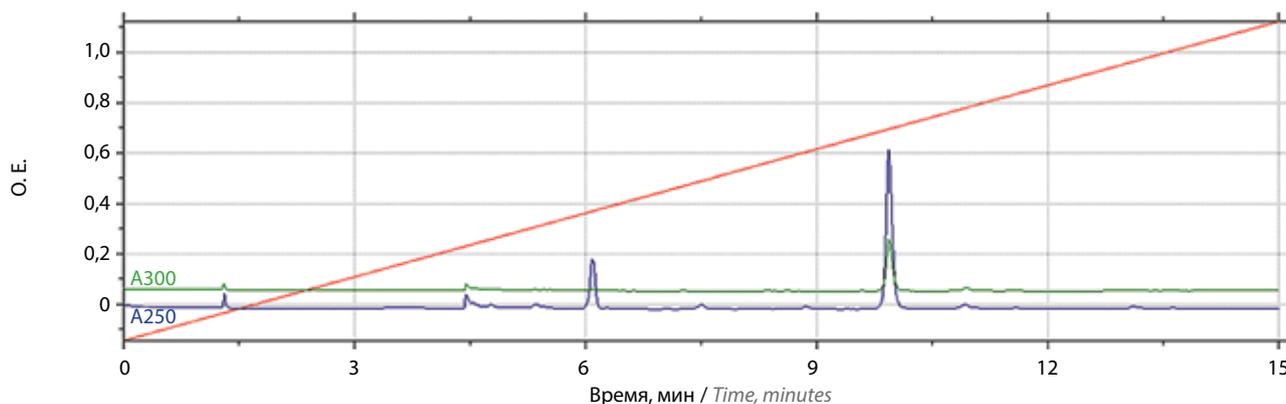


Рис. 2. Хроматограмма рабочего стандартного образца нифедипина

Fig. 2. Chromatogram of a standard sample of nifedipine

требованиям. На хроматограмме раствора стандартного образца:

- эффективность хроматографической колонки (N), рассчитанная по пику нифедипина, составила 15 438 теоретических тарелок (должна быть не менее 1500 теоретических тарелок);
- фактор асимметрии для пика нифедипина — 1,32 (должен быть не менее 1,30) (рис. 2).

Валидацию методики проводили по показателю «специфичность». С этой целью регистрировали хроматограмму раствора образца плацебо (интактной плазмы), на которой не обнаружили пиков, совпадающих по времени удерживания с пиком нифедипина. Это позволяет говорить об отсутствии в плазме веществ, искажающих результат анализа (рис. 3) и специфичности используемой методики.

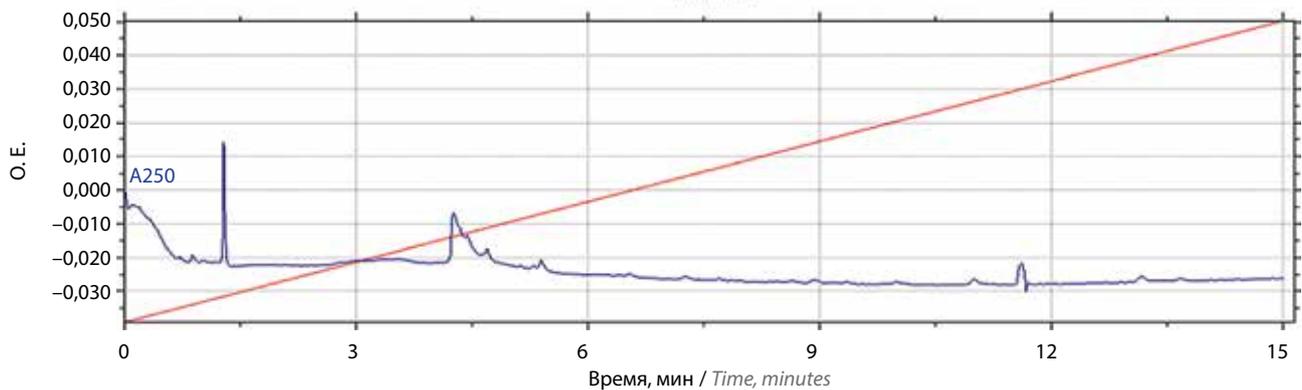


Рис. 3. Хроматограмма плазмы крови интактных животных

Fig. 3. Chromatogram of blood plasma of intact animals

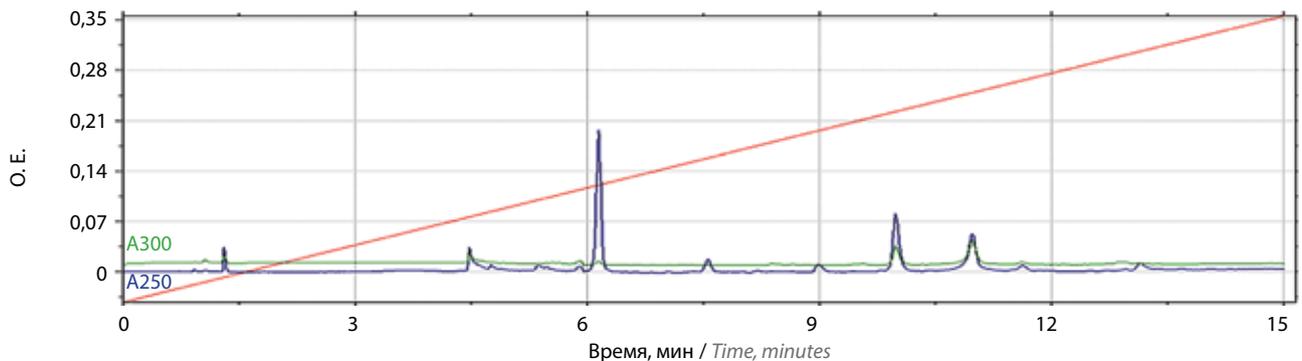


Рис. 4. Хроматограмма плазмы крови животных, на кожу которых наносили образцы геля с нифедипином

Fig. 4. Chromatogram of blood plasma of animals on whose skin samples of gel with nifedipine were applied

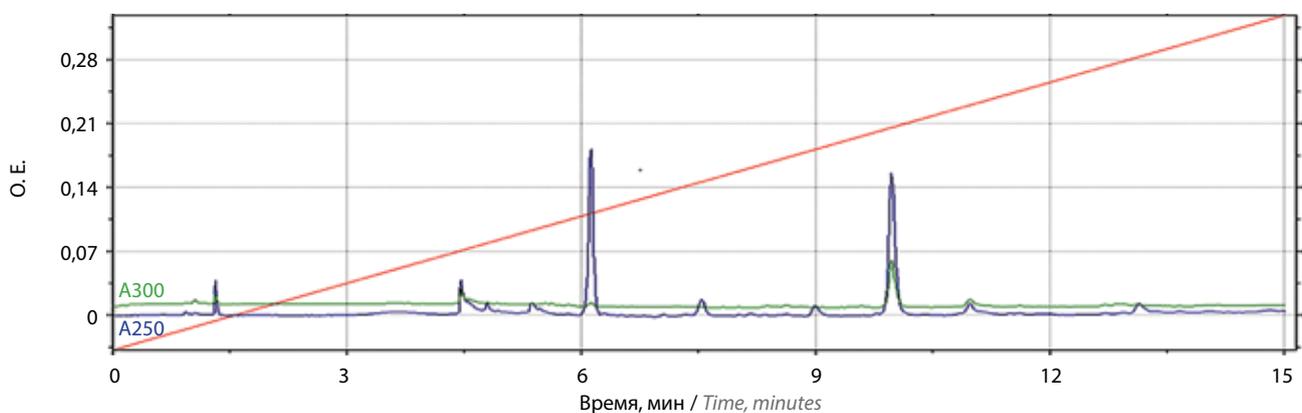


Рис. 5. Хроматограмма плазмы крови животных, на кожу которых наносили образцы пластыря с нифедипином

Fig. 5. Chromatogram of blood plasma of animals on whose skin samples of a patch with nifedipine were applied

Результаты

На хроматограмме раствора стандартного образца (см. рис. 2) видно, что пик, соответствующий нифедипину, имеет время удерживания 10 мин.

На хроматограммах образцов плазмы крови животных, на кожу которых наносили образцы трансдермального геля, обнаруживали пик, по времени удерживания совпадающий со временем удерживания нифедипина на хроматограмме стандартного образца (рис. 4).

На хроматограммах образцов плазмы крови крыс, на кожу которых наносили трансдермальный пла-

стырь, также регистрировали пик, время удерживания которого соответствовало времени удерживания нифедипина на хроматограмме стандартного образца (рис. 5).

Заключение

В результате проведенного исследования подтверждена возможность трансдермального проникновения нифедипина. Полученные данные позволяют продолжить исследования по разработке трансдермальных лекарственных форм — геля и пластыря — на основе фармацевтической субстанции нифедипина.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Заславская Р.М., Векленко Г.В., Тейблум М.М. Хроническая устойчивость к кордипину (нифедипину) больных стенокардией. *The scientific heritage* 2022;2(84):22–4. DOI: 10.24412/9215-0365-2022-84-2-22-24
Zaslavskaya R.M., Veklenko G.V., Teiblum M.M. Chronosensitivity to cordipine (nifedipine) in patients with angina. *The scientific heritage* 2022;2(84):22–4. (In Russ.). DOI: 10.24412/9215-0365-2022-84-2-22-24
2. Абрицова М.В., Торчуа Н.Р., Богданова Е.М., Маркина М.А. Безоперационное лечение хронической анальной трещины. *Амбулаторная хирургия* 2022;19(1):90–6. DOI: 10.21518/1995-1477-2022-19-1-90-6
Abritsova M.V., Torchua N.R., Bogdanova E.M., Markina M.A. Non-surgical treatment of chronic anal fissure. *Ambulаторная khirurgiya = Outpatient Surgery* 2022;19(1):90–6. (In Russ.). DOI: 10.21518/1995-1477-2022-19-1-90-6
3. Родина Т.А., Мельников Е.С., Белков С.А. и др. Терапевтический лекарственный мониторинг нифедипина методом ВЭЖХ-МС/МС при лечении артериальной гипертензии. *Биомедицина* 2017;(3):53–69.
Rodina T.A., Melnikov E.S., Belkov S.A. et al. Therapeutic drug monitoring of nifedipine by HPLC-MS/MS in the treatment of arterial hypertension. *Biomedicina = Biomedicine* 2017;(3):53–69 (In Russ.).
4. Мельников Е.С., Белова М.В., Родина Т.А., Раменская Г.В. Определение некоторых гипотензивных лекарственных веществ в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/танDEMной масс-спектрометрии при анализе острых отравлений. Сорбционные и хроматографические процессы 2015;(15-2):257–68. DOI: 10.17308/sorpchrom.2015.15/274
Melnikov, E.S., Belova M.V., Rodina T.A., Ramenskaya G.V. Determination of certain antihypertensive drugs in blood plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry in the analysis of acute poisoning. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie processy = Sorption and Chromatographic Processes* 2015;(15-2):257–68. (In Russ.). DOI: 10.17308/sorpchrom.2015.15/274
5. Подорожная М.Г., Гладух Е.В. Разработка состава и технология ранозаживляющего действия. *Norwegian journal of development of the international science* 2018;(8):54–8.
Podorozhnaya M.G., Gladukh E.V. Development of the composition and technology of wound healing action. *Norwegian journal of development of the international science* 2018;(8):54–8. (In Russ.).
6. Шаколо Т.В., Хишова О.М. Некоторые аспекты фармацевтической разработки дерматологических гелей. *Вестник фармации* 2018;4(82):99–104.
Shakolo T.V., Hishova O.M. Some aspects of pharmaceutical development of dermatological gels. *Vestnik farmacii = Bulletin of Pharmacy* 2018;4(82):99–104. (In Russ.).
7. Затолокин В.В., Вечерский Ю.Ю., Манвелян Д.В., Козлов Б.Н. Роль антагонистов кальциевых каналов дигидропиридиновой группы при операции коронарного шунтирования с использованием лучевой артерии. *Российский кардиологический журнал* 2022;27(8):80–4. DOI: 10.15829/1560-4071-2022-4744
Zatolokin V.V., Vechersky Yu.Yu., Manvelyan D.V. The role of calcium channel antagonists of the dihydropyridine group in coronary bypass surgery using Radial Artery. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Cardiology* 2022;27(8):80–4. (In Russ.). DOI: 10.15829/1560-4071-2022-4744
8. Квачахия Л.Л., Шорманов В.К., Дорожжина Н.Е., Ананьева Е.А. Особенности изолирования нифедипина из биологического материала. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация* 2019;1:159–65.
Kvachakhia L.L., Shormanov V.K., Dorozhkina N.E., Ananyeva E.A. Features of nifedipine isolation from biological material. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*, 2019;1:159–65. (In Russ.).
9. Квачахия Л.Л., Шорманов В.К. Идентификация и количественное определение нифедипина в биологической жидкости. В сб. трудов конференции: «Фармацевтическое образование, наука и практика: горизонты развития». Под ред. В.А. Лазаренко, И.Л. Дроздовой, И.В. Зубковой, О.О. Куриловой. Курск: КГМУ, 2016. С. 400–402.
Kvachakhia L.L., Shormanov V.K. Identification and quantitative determination of nifedipine in biological fluid. In: *Proceedings of the conference “Pharmaceutical education, science and practice: development horizons”*. Ed. by V.A. Lazarenko, I.L. Drozdova, I.V. Zubkova, O.O. Kurilova. Kursk: KGMU, 2016. P. 400–402. (In Russ.).
10. Гиляревский С.Р. Изменение представлений о тактике при остром выраженном повышении артериального давления в отсутствие поражения органов мишеней. *Южно-российский журнал терапевтической практики* 2020;1(1):33–7. DOI: 10.21886/2712-8156-2020-1-1-33-7
Gilyarevsky S.R. Changing ideas about tactics in acute marked increase in blood pressure in the absence of damage to target organs. *Yuzhno-rossiyskiy zhurnal terapevticheskoy praktiki = South-Russian Journal of Therapeutic Practice* 2020;1(1):33–7. (In Russ.). DOI: 10.21886/2712-8156-2020-1-1-33-7

Вклад авторов

В.В. Токаев: помощь в проведении фармакологической части работы;
Э.Ф. Степанова: написание и редактирование текста статьи;
Д.И. Поздняков: проведение фармакологической части работы;
М.С. Макиева, Ю.А. Морозов, Д.И. Гаглоева: проведение химико-аналитической части работы и получение результатов.

Author's contributions

V.V. Tokaev: assistance in conducting the pharmacological part of the work;
E.F. Stepanova: article writing and editing;
D.I. Pozdnyakov: carrying out the pharmacological part of the work;
M.S. Makieva, Yu.A. Morozov, D.I. Gagloeva: carrying out the chemical and analytical part of the work and obtaining the results.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.В. Токаев / V.V. Tokaev: <https://orcid.org/0000-0002-7133-8258>
Э.Ф. Степанова / E.F. Stepanova: <https://orcid.org/0000-0002-4082-3330>
Д.И. Поздняков / D.I. Pozdnyakov: <https://orcid.org/0000-0002-5595-8182>
М.С. Макиева / M.S. Makieva: <https://orcid.org/0000-0002-2232-5549>
Ю.А. Морозов / Yu.A. Morozov: <https://orcid.org/0000-0002-6260-1341>
Д.И. Гаглоева / D.I. Gagloeva: <https://orcid.org/0000-0002-7106-7582>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance with the rules of bioethics. The study was carried out in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Research and Other Scientific Purposes.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 11.01.2023. Принята к публикации: 20.02.2023.

Article received: 11.01.2023. Accepted for publication: 20.02.2023.



К 100-летию академика Анатолия Андреевича ВОРОБЬЕВА (05.02.1923–23.03.2006)

To the 100th anniversary of the academician
Anatoliy Andreevich VOROBYOV (05.02.1923–23.03.2006)

5 февраля 2023 г. исполнилось 100 лет со дня рождения академика РАМН, профессора, доктора медицинских наук, генерал-майора медицинской службы, лауреата Государственных премий СССР и РФ, премии Правительства РФ, заслуженного деятеля науки РФ Анатолия Андреевича Воробьева – крупного ученого иммунолога и микробиолога.

А.А. Воробьев – кавалер орденов Отечественной войны I степени, Красной Звезды, Трудового Красного Знамени. Научные работы Анатолия Андреевича отмечены премиями имени И.П. Павлова, имени Н.Ф. Гамалеи, имени М.П. Чумакова.

А.А. Воробьев являлся заместителем академика-секретаря Отделения профилактической медицины РАМН, заместителем председателя экспертного совета ВАК РФ, председателем Центральной учебно-методической комиссии по преподаванию микробиологии и иммунологии Минздрава РФ, председателем Ученого совета по защите докторских диссертаций, президентом Всероссийского общества биотехнологов, первым вице-президентом Российской академии медико-технических наук, членом Российской академии естественных наук, Академии информатизации, Международной академии, членом экспертных советов при Минздраве и Министерстве промышленности и науки РФ, членом редколлегий журналов «Вестник РАМН», «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии», «Иммунология», «Вирусология», «Вакцинация».

Окончив в 1945 г. Военно-морскую медицинскую академию в Ленинграде, А.А. Воробьев служил врачом соединения кораблей на Северном военно-морском

флоте. В годы Великой Отечественной войны принимал участие в обороне Ленинграда, служил на кораблях действующей Каспийской флотилии. С 1948 по 1951 г. А.А. Воробьев учился в адъюнктуре на кафедре физической и коллоидной химии и кафедре микробиологии Военно-морской медицинской академии, где затем работал в должности старшего научного сотрудника. В 1951 г. Анатолий Андреевич защитил кандидатскую диссертацию по анатоксинам. В 1956–1978 гг. А.А. Воробьев работал в НИИ Министерства обороны СССР начальником научного отдела, заместителем начальника по науке. В 1960 г. защитил докторскую диссертацию, в 1964 г. ему было присвоено звание профессора по специальности «иммунология».

В 1978–1987 гг. Анатолий Андреевич был первым заместителем по науке начальника Главного управления «Биопрепарат» при Министерстве медицинской и микробиологической промышленности СССР. С 1987 г. заведовал кафедрой микробиологии с вирусологией и иммунологией Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова. Под его руководством защищены 42 кандидатские и 36 докторских диссертаций.

А.А. Воробьев опубликовал около 600 научных работ, включая 25 монографий, посвященных вопросам общей

иммунологии и иммунопрофилактики инфекционных болезней; изучению молекулярных механизмов и разработке принципов модуляции иммунитета, созданию на их основе молекулярных и синтетических вакцин; современным аспектам биотехнологии микробиологического синтеза, разработке профилактических и лечебных препаратов на основе генно-инженерных продуцентов. Под его руководством созданы высокоочищенные сорбированные анатоксины и полианатоксины, применяемые для иммунизации против столбняка, дифтерии, химические вакцины против Ку-лихорадки, эпидемического сыпного тифа, а также проведены работы по внедрению в практику иммунизации безыгольных инъекторов. А.А. Воробьевым разработаны принципы конструирования адъювантных вакцин, изучен механизм действия адъювантов. Разработан и внедрен в практику первый в нашей стране генно-инженерный продукт – реаферон-альфа 2. Значительное внимание он уделял исследованию количественных закономерностей иммуногенеза, проблемам стандартизации биопрепаратов.

Большой интерес и конструктивное участие в своей творческой научной деятельности А.А. Воробьев проявлял к онкологическому направлению, посвященному ключевым аспектам иммуноадгезионных

механизмов при развитии опухолевого процесса и путей их коррекции с применением нетоксичных препаратов, своего рода антистрессорных вакцин, или фитоадаптогенов-геропротекторов при доброкачественных, злокачественных процессах, а также при нейродегенеративных заболеваниях. Был убежден, что подобного рода препараты эффективны при использовании в сопроводительной терапии и реабилитации онкологических больных.

Вместе с тем, как писал Анатолий Андреевич, подобные препараты могут использоваться в условиях техногенных катастроф (жителями экологически неблагоприятных районов, контингентом с наследственной предрасположенностью к опухолевым заболеваниям), а также на предприятиях с вредными условиями

труда (Минатома, Минобороны, химической промышленности и т. п.) для предупреждения профзаболеваний. Кроме того, он считал перспективным применение комплексных фитоадаптогенов для профилактики инфекционной и общей заболеваемости, в основе которой лежат иммунодефицитные состояния. Академик А. А. Воробьев активно содействовал исследованиям, которые открывают перспективы создания нетоксичных лекарственных-геропротекторов для эффективной профилактики и лечения новообразований, возрастных патологий, а также увеличения продолжительности жизни человека.

Научные труды А. А. Воробьева оригинальны и приоритетны. Они вошли в медицинские руководства и учебники,

послужили воспитанию медицинского мышления нескольких поколений ученых и врачей. Ученый внес весомый вклад в координацию научных медико-биологических исследований и деятельности научных учреждений, в прогнозирование развития медицинской науки. Труды ученого определили новые направления медико-биологической науки, способствуя ее прорыву в будущее.

Талантливый, искрометный и мудрый, врач, военный, ученый, педагог, Анатолий Андреевич писал и удивительные стихи! Яркая, творческая личность Анатолия Андреевича, нацеленная на плодотворную, конструктивную деятельность, вместе с тем неутомимая, смелая и решительная, остается в сердцах его учеников, соратников, коллег и друзей!

Редакция журнала выражает благодарность доктору биологических наук, профессору, руководителю лаборатории иммунофармакологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России О.А. Бочаровой за помощь в подготовке этой публикации.