

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



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

Российский Биотерапевтический Журнал 2023 • Том 22 • № 4



Russian Journal
of Biotherapy

4

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

4^{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 Ю.Н. Бирюкова
Корректор Т.Н. Помилуйко
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. № 4. 1–76.
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2023

Подписной индекс в каталоге агентства
«Роспечать» – 81679.
Отпечатано в типографии «Лайдер принт».
105082, Москва, Переведеновский пер., 13, стр. 16.

Тираж 1000 экз. Бесплатно.
<http://bioterapevt.elpub.ru>

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

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

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

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)

Курбатова Екатерина Алексеевна, д.м.н., профессор, заведующая лабораторией терапевтических вакцин ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Москва, 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)

Оборогова Наталья 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)

Рапорт 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

4^{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 Yu.N. Biriukova

Proofreader T.N. Pomiluyko

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 4. 1–76.

© PH "ABV-Press", 2023

Rospechat' catalogue index: 81679.

Printed at the Leader Print Ltd

Bld. 16, 13 Perevedenovsky lane,
Moscow 105082.

1,000 copies. Free distribution

<http://bioterapevt.elpub.ru>

EDITOR-IN-CHIEF

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

DEPUTIES EDITOR-IN-CHIEF

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

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

EXECUTIVE EDITOR

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

EDITORIAL BOARD

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

Bunyatyayn, 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)*

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. Postovskiy Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of Russian Academy of Sciences (Ekaterinburg, Russia)*

Kurbatova, Ekaterina A., *PhD, DSc, Professor, Head of Laboratory of Therapeutic Vaccines, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Moscow, 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 Immunochimistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (Nizhniy 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

- И.Р. Набиев, М.А. Барышникова, З.А. Соколова, П.М. Соколов, А.В. Караулов*
Многopараметрический иммуногистохимический анализ в диагностике онкологических заболеваний (обзор литературы) 10
- П.М. Соколов, П.С. Самохвалов, Д.А. Баранова, А.В. Суханова*
Принципы и подходы к созданию флуоресцентных гидрогелей для диагностики онкологических заболеваний 17

ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ И ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

- А.Д. Ширин, А.С. Антипова, О.Ю. Баранова, А.М. Ибрагимов*
Диагностика миелодиспластических синдромов после цитотоксической терапии острого миелоидного лейкоза в эру молекулярных исследований, трудности стратификации риска и выбора терапии: первое отечественное описание клинического случая и обзор литературы 28

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- О.А. Коровин, А.В. Алясова, Х.М. Ариуа, Д.В. Новиков, Н.В. Красногорова, В.В. Новиков*
Анализ уровня мРНК ИЛ-10 в периферической крови больных раком и доброкачественной гиперплазией предстательной железы 35
- Э.А. Ахматова, Е.В. Сорокина, И.Ж. Шубина, Е.А. Курбатова, В.Н. Столпникова, Е.О. Калинин, И.В. Бишева, С.А. Сходова*
Клетки врожденного иммунитета в модели острого псориазоподобного воспаления у мышей 43
- Е.А. Курбатова, И.В. Яковлева, Н.Ф. Гаврилова, Д.С. Воробьев, Е.С. Петухова, И.Б. Семенова, А.Е. Зайцев, Ю.В. Волох, А.Ю. Леонова, А.В. Поддубиков, А.А. Калошин, И.М. Грубер*
Разработка тест-системы на основе иммуноферментного анализа для детекции рекомбинантного пневмолизина *Streptococcus pneumoniae* 52
- Е.В. Санарова, А.В. Ланцова, Л.Л. Николаева, В.Н. Осипов, Д.В. Гусев, Л.М. Борисова*
Солубилизация производного 3-гидроксикиназолина, обладающего противоопухолевой активностью. 60
- Ю.А. Полковникова*
Моделирование высвобождения винпоцетина из микрокапсул на основе альгината натрия и хитозана методом молекулярной динамики 68

REVIEWS

Igor R. Nabiev, Maria A. Baryshnikova, Zinaida A. Sokolova, Pavel M. Sokolov, Alexander V. Karaulov
Multiparametric immunohistochemical analysis in cancer diagnosis (literary review) 10

Pavel M. Sokolov, Pavel S. Samokhvalov, Daria A. Baranova, Alyona V. Sukhanova
Principles and approaches in the development of fluorescent hydrogels for cancer diagnosis 17

A CASE REPORT AND LITERATURE REVIEW

Anton D. Shirin, Alina S. Antipova, Olga Yu. Baranova, Aidemir M. Ibragimov
Diagnosis of myelodysplastic syndromes after cytotoxic therapy for acute myeloid leukemia in the era of molecular research, difficulties in risk stratification and choice of therapy: The first domestic case report and literature review 28

ORIGINAL REPORTS

Oleg A. Korovin, Anna V. Alyasova, Khalil M. Arioua, Dmitriy V. Novikov, Natalya V. Krasnogorova, Victor V. Novikov
Analysis of the *IL-10* mRNA level in the peripheral blood of patients with cancer and benign prostatic hyperplasia 35

Elina A. Akhmatova, Ekaterina V. Sorokina, Irina Zh. Shubina, Ekaterina A. Kurbatova, Vera N. Stolpnikova, Evgeny O. Kalinichenko, Irina V. Bisheva, Svetlana A. Skhodova
Innate immunity cells in a model of acute psoriasis-like inflammation in mice. 43

Ekaterina A. Kurbatova, Irina V. Yakovleva, Natalya F. Gavrilova, Denis S. Vorobyev, Ekaterina S. Petukhova, Irina B. Semenova, Anton E. Zaitsev, Yury V. Volokh, Anna Yu. Leonova, Alexander V. Poddubikov, Alexey A. Kaloshin, Irina M. Gruber
Development of the test system based on enzyme immunoassay for the detection of recombinant *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin 52

Ekaterina V. Sanarova, Anna V. Lantsova, Ludmila L. Nikolaeva, Vasiliy N. Osipov, Dmitriy V. Gusev, Larisa M. Borisova
Solubilization of 3-hydroxyquinazoline derivative with antitumor activity 60

Yulia A. Polkovnikova
Modeling the release of vinpocetine from microcapsules based on sodium alginate and chitosan by molecular dynamics 68

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-10-16>

Многopараметрический иммуногистохимический анализ в диагностике онкологических заболеваний (обзор литературы)

И.Р. Набиев^{1,2}, М.А. Барышникова³, З.А. Соколова³, П.М. Соколов^{2,4}, А.В. Караулов²

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

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

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

⁴LIFT (Life Improvement by Future Technologies) Центр; Россия, 121205 Москва, Сколково, ул. Нобеля, 5

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

Введение. Многopараметрический сравнительный анализ клинических и молекулярно-генетических биомаркеров злокачественных новообразований обладает мощным диагностическим и прогностическим потенциалом и является необходимой предпосылкой для развития персонализированной медицины. Данный подход позволяет не только одновременно выявить экспрессию определенных биомаркеров опухоли, но и получить данные об их пространственном распределении в исследуемых тканях, а также оценить взаимное расположение клеток опухоли и ее микроокружения, экспрессирующих те или иные биомаркеры. Таким образом, многopараметрический иммуногистохимический анализ, позволяющий не только подтвердить наличие определенной нозологии, но и провести 3D-визуализацию биоптатов, изучить пространственную организацию опухолевой ткани и уровни экспрессии биомаркеров на уровне единичных клеток, может открыть широкие перспективы в диагностике и лечении онкологических заболеваний.

Цель исследования – систематизировать данные о возможностях многopараметрического иммуногистохимического анализа для диагностики и развития персонализированного подхода к терапии онкологических заболеваний.

Результаты. Многopараметрический иммуногистохимический анализ дает возможность оценивать гетерогенность опухолей на уровне молекулярных подтипов, а также гетерогенность опухолевого микроокружения, таким образом позволяет прогнозировать развитие опухоли, определить ее метастатический потенциал, а также выбрать эффективную стратегию для подбора индивидуальной терапии.

Заключение. В настоящем обзоре проанализированы результаты использования многopараметрического иммуногистохимического анализа для детекции онкологических заболеваний, показан высокий потенциал этого метода для дифференциации онкологических нозологий и исследования микроокружения опухолей, что позволяет эффективно выбрать терапевтическую стратегию и оценить ответ опухоли на терапию.

Ключевые слова: многopараметрическая детекция, иммуногистохимический анализ, иммунофлуоресценция, биомаркеры рака, микроокружение опухоли

Для цитирования: Набиев И. Р., Барышникова М. А., Соколова З. А. и др. Многopараметрический иммуногистохимический анализ в диагностике онкологических заболеваний (обзор литературы). Российский биотерапевтический журнал 2023;22(4):10–6. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-10-16>

Multiparametric immunohistochemical analysis in cancer diagnosis (literary review)

Igor R. Nabiev^{1,2}, Maria A. Baryshnikova³, Zinaida A. Sokolova³, Pavel M. Sokolov^{2,4}, Alexander V. Karaulov²

¹Université de Reims Champagne-Ardenne; 51 rue Cognacq Jay, 51100 Reims, France;

²Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); bld. 2, 8 Trubetskaya St., 119146 Moscow, Russia;

³N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, 115522 Moscow, Russia;

⁴Life Improvement by Future Technologies (LIFT) Center, 5 Nobelya St., Skolkovo, 121205 Moscow, Russia

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

Introduction. Multiparametric comparative analysis of clinical and molecular genetic biomarkers of malignant tumors has strong diagnostic and prognostic potentials and is a prerequisite for the development of personalized medicine. This approach makes it possible not only to simultaneously detect the expression of several tumor biomarkers, but also to obtain data on their spatial distribution in tissues examined, as well as to estimate the mutual location of tumor cells and tumor microenvironment expressing specific biomarkers. Thus, multiparametric immunohistochemical analysis (IHCA), which allows not only confirming the specific disease, but also carrying out 3D imaging of biopsy specimens and analyzing the spatial organization of tumor tissue, as well as the expression rates of biomarkers at the level of individual cells, opens wide prospects in the diagnosis and treatment of cancer.

Aim. Systematizing data on the potential of multiparametric IHCA for cancer diagnosis and development of the personalized approach to cancer therapy.

Results. Multiparametric IHCA allows estimating the heterogeneity of the tumor at the level of molecular subtypes, as well as the heterogeneity of the tumor microenvironment. These data make it possible to predict tumor development, determine its metastatic potential, and select an effective strategy for individual therapy.

Conclusion. This review analyzes the use of multiparametric IHCA for the detection of malignant tumors and shows its high potential for the differentiation of tumors and the study of tumor microenvironment. This ensures effective selection of the therapeutic strategy and accurate assessment of the response to therapy.

Keywords: multiparametric detection, immunohistochemical analysis, immunofluorescence, cancer biomarkers, tumor microenvironment

For citation: Nabiev I.R., Baryshnikova M.A., Sokolova Z.A. et al. Multiparametric immunohistochemical analysis in cancer diagnosis (literary review). *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2023;22(4):10–6. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-10-16>

Введение

Определение тканевых биомаркеров широко используется в дифференциальной диагностике онкологических заболеваний с целью классификации типов и подтипов опухолей, оценки прогноза, а также для выбора эффективной терапевтической стратегии [1, 2]. Тем не менее с развитием персонализированной медицины увеличивается потребность в индивидуальном подходе к высокочувствительной ранней детекции и получении дополнительной информации о динамике опухолевого роста. В научной литературе имеются данные об успешном использовании омиксных технологий, которые могут иметь потенциальное значение для будущего развития онкологии, например сравнительный анализ маркеров микробиоты в цельной крови и тканях [3], или протеомный анализ образцов крови пациентов с целью составления атласа количественного содержания белков в крови при определенных онкологических нозологиях и выявления корреляции с помощью искусственного интеллекта [4]. Необходимость исследования более широкого числа биомаркеров также обусловлена развитием таргетной терапии и иммунотерапии, для назначения которых требуется более точное профилирование опухолевых тканей (ОТ) и клеток (ОК) микроокружения опухоли (МО). Вместе с тем золотым стандартом в клинической диагностике для подтверждения диагноза остается иммуногистохимический (ИГХ) анализ ОТ. Логичным развитием стандартного ИГХ-анализа стало появление методов многопараметрического ИГХ-окрашивания, что в немалой степени обусловлено накоплением

данных, свидетельствующих о высокой гетерогенности опухолей и их МО, открытием новых биомаркеров, а также необходимостью пространственной визуализации распределения множества биомаркеров опухоли и ее МО на уровне единичных клеток [5]. Таким образом, в последние несколько лет прогрессивно увеличивается интерес к возможностям многопараметрического ИГХ-анализа для исследования различных видов злокачественных новообразований (см. таблицу).

Дифференциация опухолевых клеток и микроокружения опухоли

Установление типа и подтипа рака требует детекции нескольких биомаркеров. Например, установление таких молекулярных подтипов рака молочной железы (РМЖ), как HER2⁺, люминальный А, люминальный В (HER2⁺ или HER2⁻) и тройной негативный подтип, может быть основано на детекции панели биомаркеров, состоящей из HER2, эстрогенового рецептора (ER), прогестеронового рецептора (PR) и Ki67. Детекция EGFR и базальных цитокератинов (CK14 и CK5/6) может помочь в идентификации тройного негативного подтипа и уточнить прогноз развития опухоли [14]. А.М. Cheung и соавт. исследовали ОТ РМЖ, однако, кроме стандартных биомаркеров ER, PR, HER2, Ki67, для исследования гетерогенности опухоли внутри существующих молекулярных подтипов РМЖ они использовали дополнительные биомаркеры: TP53, CDKN1A (P21/WAF1), CDKN2A (P16INK4A), CD8 и CD20 [6]. Для проведения многопараметрической ИГХ-количественной детекции

Использование многопараметрического иммуногистохимического анализа в онкологии

The use of multiparametric immunohistochemical analysis in oncology

Тип рака Type of cancer	Детектируемые биомаркеры/принцип детекции Detected markers/detection principle	Преимущества Advantages	Источник Source
Дифференциация опухолевых клеток и микроокружения опухоли Differentiation of tumor cells and the tumor microenvironment			
Рак молочной железы Breast cancer	ER, PR, HER2, Ki67, TP53, CDKN1A (P21/WAF1), CDKN2A (P16INK4A), CD8, CD20. Флуоресцентная детекция Fluorescence detection	Позволяет проводить изучение гетерогенности опухолей внутри молекулярных подтипов The possibility of studying the tumor heterogeneity within molecular subtypes	[6]
Рак молочной железы Breast cancer	ER, PR, HER2, Ki67, CD3, CD4, CD8, CD45RO, CD20, CD68, pan-CK, H2A.X. Масс-спектрометрическая детекция Mass spectrometry detection	Позволяет определять гистологический тип рака молочной железы и детектировать иммунные клетки микроокружения клеток The possibility of determining the histological type of breast cancer and detecting immune cells in the tumor microenvironment	[7]
Профилирование иммунных клеток микроокружения клеток Profiling immune cells of the tumor microenvironment			
Немелкоклеточный рак легкого Non-small-cell lung cancer	PD-L1, CD68, CD8, CK. Флуоресцентная детекция Fluorescence detection	Позволяет дифференцировать PD-L1 ⁺ -клетки среди макрофагов, Т-лимфоцитов и опухолевых клеток The possibility of differentiating PD-L1 ⁺ cells among macrophages, T cells, and tumor cells	[8]
Рак молочной железы Breast cancer	PD-L1, CD3, CD8, CK, FoxP3, CD163. Флуоресцентная детекция Fluorescence detection	Позволяет дифференцировать PD-L1 ⁺ -клетки среди хелперных Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов, макрофагов, регуляторных Т-лимфоцитов и опухолевых клеток The possibility of differentiating PD-L1 ⁺ cells among T helper cells, cytotoxic T cells, macrophages, regulatory T cells, and tumor cells	[9]
Колоректальный рак Colorectal cancer	CD4, CD8, CD20, FoxP3, CD45RO, CD3, NKp46, CD56, CD68, CD163, CD1a, CD208, CD123, CD15, CK. Флуоресцентная детекция Fluorescence detection	Позволяет дифференцировать 15 типов иммунных клеток микроокружения опухоли, выявляя подклассы Т-лимфоцитов, включая CD4 ⁺ - и CD8 ⁺ -лимфоциты, регуляторные Т-лимфоциты и естественные киллеры, а также В-лимфоциты, М1- и М2-макрофаги, миелоидные клетки и плазматоидные дендритные клетки The possibility of differentiating 15 types of immune cells of the tumor microenvironment and identify T cell subtypes, including CD4 ⁺ and CD8 ⁺ lymphocytes, regulatory T cells, and natural killer cells, as well as B cells, M1 and M2 macrophages, myeloid cells, and plasmacytoid dendritic cells	[10]
Диагностика и прогноз Diagnosis and prognosis			
Колоректальный рак Colorectal cancer	CD133, HER2, PD-L1, CD68. Флуоресцентная детекция Fluorescence detection	Детекция уровня экспрессии потенциальных биомаркеров CD133 и PD-L1 позволяет проводить дифференциальную диагностику на ранней стадии развития опухоли. При этом уровень экспрессии биомаркера HER2 может служить индикатором агрессивности опухолевого роста, а детекция биомаркера CD68 уточняет метастатический потенциал опухоли Estimation of the expression rate of the CD133 and PD-L1 potential markers enables differential diagnosis at the early stage of tumor growth. The HER2 marker expression rate can serve as an indicator of aggressive tumor growth, and the detection of the CD68 marker allows more accurate estimation of the tumor metastatic potential	[11]

Окончание таблицы

End of table

Тип рака Type of cancer	Детектируемые биомаркеры/принцип детекции Detected markers/detection principle	Преимущества Advantages	Источник Source
Плоскоклеточная карцинома шеи и головы Squamous cell carcinoma of the head and neck	PD-1, CD3, ROR γ t, CD56, CD8, T-bet, GATA-3, FoxP3, PD-L1, CD20, CD45, p16, Tryptase, CD68, CSF1R, DC-SIGN, CD66b, CD83, CD163, MHC II, CD3/20/56. Серийная хромогенная детекция Sequential chromogenic detection	Позволяет выявить дифференциальные иммунные профили, основанные на детекции лимфоидных и миелоидных клеток, коррелирующих со статусом вируса папилломы человека и прогнозом онкозаболевания The possibility of identifying differential immune profiles based on the detection of lymphoid and myeloid cells correlated with the human papilloma virus status and cancer prognosis	[12]
Аденокарцинома легкого Pulmonary adenocarcinoma	CD31, коллаген тип IV CD31, type IV collagen, TTF-1 и E-кадгерин TTF-1 and E-cadherin Флуоресцентная детекция Fluorescence detection	Позволяет определить пространственную архитектуру кластеров опухолевых клеток в паренхиме легкого и воздушном пространстве альвеол, а также предсказать частоту рецидивов и выживаемость пациентов с ограниченной резекцией The possibilities of determining the spatial architecture of tumor cell clusters in the lung parenchyma and alveolar air space and predicting the relapse rate and survival of patients after limited resection.	[13]

авторы применяли конъюгаты антител с флуоресцентными красителями (ФРК) Cy3 и Cy5, при этом после детекции определенной пары биомаркеров проводили инактивацию ФРК и последовательно окрашивали следующую пару. Таким образом проанализировано 225086 единичных клеток в 101 участке срезов ОТ 59 пациентов, что позволило выделить высокую гетерогенность и пространственную изменчивость опухолей внутри классических молекулярных подтипов. Эти результаты свидетельствуют о необходимости более точной дифференциации РМЖ на основе определения уровней экспрессии биомаркеров и оценки корреляции с клиническими данными, что позволит улучшить точность фенотипирования РМЖ и прогнозирование ответа на персонализированную терапию. G. Yagnik и соавт. в недавнем исследовании предложили метод одновременной детекции сразу 12 тканевых биомаркеров, включая классические биомаркеры РМЖ – ER, PR, HER2 и Ki67; биомаркеры иммунных клеток – CD3, CD4, CD8, CD45RO, CD20 и CD68; цитокератины и биомаркер клеточного ядра H2A.X (гистон H2A.X) [7]. Для многопараметрической детекции использован метод масс-спектрометрической детекции (МСД), основанный на детекции пептидных меток заданной молекулярной массы в плоскости среза ткани с помощью масс-спектрометра. Для осуществления детекции предварительно были получены конъюгаты антител, специфически распознающих определенные биомаркеры с маркерным пептидом. Мультиплексность оптических методов детекции, как правило, ограничена спектральными свойствами используемых органических

ФРК, в то время как разрешение метода МСД позволяет детектировать метки, отличающиеся по массе менее чем на 1 Да, обеспечивая возможность одновременной детекции неограниченного количества тканевых биомаркеров. Однако пространственное разрешение МСД составляет всего 1,4 мкм, что существенно хуже пространственного разрешения оптических методов, разрешение которых составляет 0,2 мкм и менее. Между тем примененный подход позволил всего на одном образце ОТ определить все маркеры, необходимые как для определения молекулярных подтипов РМЖ, так и для детекции различных типов иммунных клеток МО.

Профилирование иммунных клеток микроокружения опухоли

Открытие сигнального пути PD-1/PD-L1 произвело революцию в терапии многих видов онкологических заболеваний. На данный момент одобрены 6 препаратов на основе антител, ингибирующих этот сигнальный путь, а также проходят более 10000 клинических исследований препаратов, нацеленных на него [15]. Показано, что одновременная детекция PD-L1⁺-опухолевых клеток и PD-L1⁺-иммунных клеток может улучшить эффективность и правильность подбора иммунотерапии [16]. Однако для точного типирования клеток опухоли и МО при проведении ИГХ-анализа опухоли необходимо проводить одновременное определение 2 и более биомаркеров, чтобы дифференцировать PD-L1⁺-клетки опухоли и PD-L1⁺-клетки МО. Так, F. Abdullahi Sidi и соавт. успешно провели одновременную детекцию PD-L1,

CD68 (маркера макрофагов), CD8 (маркера Т-лимфоцитов) и СК (маркера эпителиальных клеток) с помощью конъюгат соответствующих антител и ФРК семейства Oral™, используя клинические образцы ОТ пациентов с немелкоклеточным раком легкого [8]. Авторами также выполнено сравнение многопараметрической флуоресцентной детекции биомаркеров со стандартным ИГХ-окрашиванием с помощью 3,3'-диаминобензидина и показано, что совпадение результатов составляет более 95 %.

К. Sanchez и соавт. использовали метод многопараметрического иммунофлуоресцентного окрашивания для исследования изменений МО на ранних стадиях РМЖ [9]. Для этого был выбран набор из 6 тканевых биомаркеров: СК, CD3, CD8, FoxP3, CD163 и PD-L1, а для одновременной иммунодетекции использовали ФРК набора Oral™, а также тирамидную систему амплификации сигнала (PerkinElmer Inc., США). Одновременная детекция данных биомаркеров позволила точно дифференцировать ОК (СК⁺), хелперные Т-лимфоциты (CD3⁺, CD8⁻), цитотоксические Т-лимфоциты (CD3⁺, CD8⁺), макрофаги (CD163⁺) и регуляторные Т-лимфоциты (CD3⁺, FoxP3⁺) среди PD-L1⁺-клеток. Показано, что уровень экспрессии PD-L1 и пространственное распределение иммунных клеток в МО опухоли коррелируют с контрольными клиническими исследованиями. Кроме того, достигнутое высокое разрешение при определении внутриопухолевой гетерогенности позволяет детектировать фармакодинамические изменения, связанные с проведенной терапией. Данный метод также можно использовать для оценки других особенностей иммунного ответа, например связанных с лечением изменений в клеточном соотношении и кластеризации иммунных клеток в ОТ. В отличие от детекции экспрессии только биомаркера PD-L1, комплексный ИГХ-анализ потенциально может использоваться в качестве прогностического подхода при неоадьювантной терапии анти-PD-1/L1 в сочетании с химиотерапией [17].

А. Mezheyski и соавт. проведено масштабное ИГХ-изучение 5968 срезов ОТ пациентов с колоректальным раком (КРР) [10]. Для флуоресцентного ИГХ-анализа авторами использованы 3 панели антител, распознающих: 1) биомаркеры лимфоцитов (CD4, CD8, CD20, FoxP3, CD45RO и СК), 2) биомаркеры естественных киллеров/макрофагов (CD3, NKp46, CD56, CD68, CD163 и СК), 3) биомаркеры дендритных клеток (CD1a, CD208, CD123, CD15, CD3, CD68 и СК), что позволило дифференцировать 15 различных подтипов иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль, а именно: хелперные Т-лимфоциты (CD4⁺), Т-лимфоциты памяти (CD4⁺, CD45RO⁺), регуляторные Т-лимфоциты (CD4⁺, FoxP3⁺, CD45RO^{+/+} и (CD8⁺, FoxP3⁺, CD45RO^{+/+}), цитотоксические Т-лим-

фоциты (CD8⁺), эффекторные Т-лимфоциты памяти (CD8⁺, CD45RO⁺); В-лимфоциты (CD20⁺); естественные киллеры (NKp46⁺, CD56⁺), киллерные Т-лимфоциты (CD3⁺, NKp46⁺, CD56⁺), M1-макрофаги (CD68⁺), M2-макрофаги (CD68⁺, CD163⁺); миелоидные клетки (CD163⁺); незрелые дендритные клетки (CD1a⁺), зрелые дендритные клетки (CD1a⁺, CD208⁺) и плазматоидные дендритные клетки (CD123⁺). Столь детальное профилирование МО и дифференцирование КРР по установленным критериям, а также анализ корреляций с клиническими данными дали возможность получить прогностическую модель, позволяющую оценить выживаемость пациентов, а также более точно дифференцировать рак толстой кишки и рак прямой кишки. Известно, что количество CD3⁺- и CD8⁺-клеток в ОТ влияет на выживаемость пациентов [18], однако проведенный многопараметрический ИГХ-анализ А. Mezheyski и соавт. [10] позволил установить еще один важный тканевый прогностический биомаркер – количество M2-макрофагов.

Диагностика и прогноз

W. Zhang и соавт. использовали многопараметрический ИГХ-анализ для поиска новых биомаркеров КРР [11]. Для этого авторами проведено количественное определение биомаркеров CD133, HER2, PD-L1 и CD68 в образцах срезов ОТ 84 пациентов с КРР, и полученные результаты проанализированы в сопоставлении с имеющимися клиническими данными исследуемых больных. Для усиления чувствительности флуоресцентной детекции авторами использована тирамидная система амплификации сигнала (PerkinElmer Inc., США). Полученные результаты продемонстрировали то, что детекция биомаркеров CD133 и PD-L1 у пациентов с КРР наиболее информативна на ранней стадии развития опухоли, а детекция биомаркеров HER2 и CD68 – на поздних стадиях. Помимо этого, повышенная экспрессия биомаркера HER2 может служить индикатором агрессивности КРР, а степень экспрессии биомаркера CD68 потенциально может коррелировать с метастатическим потенциалом КРР. Еще одним примером широких возможностей многопараметрического ИГХ-анализа может служить исследование Т. Tsujikawa и соавт., которые провели одновременный количественный анализ биомаркеров лимфоидных и миелоидных клеток в 38 образцах тканей пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи. Для проведения ИГХ-анализа использовалась хромогенная система детекции с последовательным серийным окрашиванием [12]. Дифференциальный количественный анализ тканей проводили с использованием антител, позволяющих специфически распознавать биомаркеры лимфоидных клеток: PD-1, CD3, RORgt, CD56, CD8, T-bet, GATA-3, FoxP3, PD-L1, CD20, CD45, p16 – и биомаркеры

миелоидных клеток: Tryptase, CD68, CSF1R, DC-SIGN, CD66b, CD83, CD163, МНС II, PD-L1, CD3/20/56, CD45, p16. Проведенное исследование выявило коррелирующий с неблагоприятным прогнозом заболевания профиль иммунных клеток МО, а также оно позволило идентифицировать особенности профиля иммунных клеток у онкологических пациентов с вирусом папилломы человека.

Аналогичные исследования фенотипа лимфоидных и миелоидных клеток, проведенные авторами при изучении 24 образцов тканей больных аденокарциномой поджелудочной железы после неoadъювантной вакцинотерапии GVAX, позволили установить профиль иммунных клеток, соответствующий пациентам с неблагоприятным прогнозом. Таким образом, данные многопараметрического ИГХ-анализа подтвердили тезис о том, что иммунный контекст может эффективно использоваться в качестве основы для прогноза клинических исходов и ответа на терапию злокачественных новообразований. Известно, что пространственное распределение клеток опухоли и МО имеют существенное клиническое значение. Так, Y. Yagi и соавт. использовали многопараметрическое ИГХ-окрашивание для 3D-визуализации путей миграции раковых клеток при аденокарциноме легкого [13]. 3D-реконструкцию ОТ проводили, анализируя множество последовательных срезов ОТ после иммунофлуоресцентной детекции биомаркеров: CD31, коллагена тип IV, TTF-1 и E-кадгерина, с помощью конъюгат специфических антител и ФРК семейства Alexa Fluor™. Данный подход позволил более детально изучить морфологию ОТ и идентифицировать пути распространения ОК в воздушное пространство паренхимы легкого за пределами границ основной опухоли. Результаты пространственной 3D-визуализации, совмещенной с многопараметрической детекцией,

позволили предположить, что ОК отделяются от основной опухоли и мигрируют через воздушные пространства к стенкам отдаленных альвеол, где вновь присоединяются к ним путем кооптации сосудов. Способность клеток опухоли вновь прикрепляться к стенкам альвеол после миграции из основной опухоли может служить объяснением более высокой частоты рецидивов и худшей выживаемости пациентов, перенесших сегментэктомию легкого, по сравнению с теми пациентами, кому была выполнена лобэктомия.

Заключение

Многопараметрическая ИГХ-детекция биомаркеров может быть осуществлена с использованием различных подходов: от последовательного окрашивания хромогенными красителями и использования методов МСД до применения различных ФРК с последовательным или одновременным окрашиванием срезов опухолей и последующей 3D-реконструкцией архитектуры ОТ. Многопараметрический подход к ИГХ-детекции позволяет получать данные о пространственной организации клеток опухоли и ее МО и проводить фенотипирование различных типов клеток, используя малое количество ОТ, генерируя массивы данных, которые можно анализировать как в ручном, так и в автоматическом режимах с применением достижений искусственного интеллекта и нейросетей [19]. Таким образом, многопараметрический ИГХ-анализ открывает обширные перспективы для высокоточной дифференциальной детекции онкологических заболеваний, персонализированного подхода в выборе терапевтической стратегии, мониторинга эффективности терапии, а также может быть использован для исследования механизмов канцерогенеза и поиска новых значимых молекулярных онкомаркеров.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Füzéry A.K., Levin J., Chan M.M., Chan D.W. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: Issues and challenges. *Clin Proteomics* 2013;10(1):13. DOI: 10.1186/1559-0275-10-13
- Landegren U., Hammond M. Cancer diagnostics based on plasma protein biomarkers: Hard times but great expectations. *Mol Oncol* 2021;15(6):1715–26. DOI: 10.1002/1878-0261.12809
- Poore G.D., Kopylova E., Zhu Q. et al. Microbiome analyses of blood and tissues suggest cancer diagnostic approach. *Nature* 2020;579(7800):567–74. DOI: 10.1038/s41586-020-2095-1
- Álvarez M.B., Edfors F., von Feilitzen K. et al. Next generation pan-cancer blood proteome profiling using proximity extension assay. *Nat Commun* 2023;14(1):4308. DOI: 10.1038/s41467-023-39765-y
- Sheng W., Zhang C., Mohiuddin T.M. et al. Multiplex immunofluorescence: A powerful tool in cancer immunotherapy. *Int J Mol Sci* 2023;24(4):3086. DOI: 10.3390/ijms24043086
- Cheung A.M., Wang D., Liu K. et al. Quantitative single-cell analysis of immunofluorescence protein multiplex images illustrates biomarker spatial heterogeneity within breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res* 2021;23(1):114. DOI: 10.1186/s13058-021-01475-y
- Yagnik G., Liu Z., Rothschild K.J., Lim M.J. Highly multiplexed immunohistochemical MALDI-MS imaging of biomarkers in tissues. *J Am Soc Mass Spectrom* 2021;32(4):977–88. DOI: 10.1021/jasms.0c00473

8. Abdullahi Sidi F., Bingham V., Craig S.G. et al. PD-L1 multiplex and quantitative image analysis for molecular diagnostics. *Cancers (Basel)* 2020;13(1):29. DOI: 10.3390/cancers13010029
9. Sanchez K., Kim I., Chun B. et al. Multiplex immunofluorescence to measure dynamic changes in tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 in early-stage breast cancer. *Breast Cancer Res* 2021;23(1):2. DOI: 10.1186/s13058-020-01378-4
10. Mezheyeuski A., Micke P., Martín-Bernabé A. et al. The immune landscape of colorectal cancer. *Cancers (Basel)* 2021;13(21):5545. DOI: 10.3390/cancers13215545
11. Zhang W., Song Z.J., Zhang B.Y. et al. Multiplex immunohistochemistry indicates biomarkers in colorectal cancer. *Neoplasma* 2021;68(6):1272–82. DOI: 10.4149/neo_2021_210312N324
12. Tsujikawa T., Kumar S., Borkar R.N. et al. Quantitative multiplex immunohistochemistry reveals myeloid-inflamed tumor-immune complexity associated with poor prognosis. *Cell Rep* 2017;19(1):203–17. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.03.037
13. Yagi Y., Aly R.G., Tabata K. et al. Three-dimensional histologic, immunohistochemical, and multiplex immunofluorescence analyses of dynamic vessel co-option of spread through air spaces in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2020;15(4):589–600. DOI: 10.1016/j.jtho.2019.12.112
14. Eliyatkin N., Yalçın E., Zengel B. et al. Molecular classification of breast carcinoma: From traditional, old-fashioned way to a new age, and a new way. *J Breast Health* 2015;11(2):59–66. DOI: 10.5152/tjbh.2015.1669
15. Upadhaya S., Neftelinov S.T., Hodge J., Campbell J. Challenges and opportunities in the PD1/PDL1 inhibitor clinical trial landscape. *Nat Rev Drug Discov* 2022;21(7):482–3. DOI: 10.1038/d41573-022-00030-4
16. Lu S., Stein J.E., Rimm D.L. et al. Comparison of biomarker modalities for predicting response to PD-1/PD-L1 checkpoint blockade: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncol* 2019;5(8):1195–204. DOI: 10.1001/jamaoncol.2019.1549
17. Schmid P., Cortes J., Pusztai L. et al. Pembrolizumab for early triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2020;382(9):810–21. DOI: 10.1056/NEJMoa1910549
18. Pagès F., Mlecnik B., Marliot F. et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: A prognostic and accuracy study. *Lancet* 2018;391(10135):2128–39. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30789-X
19. Ghahremani P., Li Y., Kaufman A. et al. Deep learning-inferred multiplex immunofluorescence for immunohistochemical image quantification. *Nat Mach Intell* 2022;4(4):401–12. DOI: 10.1038/s42256-022-00471-x

Вклад авторов

И.Р. Набиев: дизайн обзора, подготовка текста, экспертный анализ текста;
 М.А. Барышникова: анализ источников литературы, экспертный анализ текста;
 З.А. Соколова: анализ источников литературы;
 П.М. Соколов: сбор, анализ данных литературы, подготовка текста;
 А.В. Караулов: анализ источников литературы, экспертный анализ текста.

Author's contribution

I.R. Nabiev: design of the review, validation of the text;
 M.A. Baryshnikova: analysis of literature data, validation of the text;
 Z.A. Sokolova: analysis of literature data;
 P.M. Sokolov: collection and analysis of literature data, text preparation;
 A.V. Karaulov: analysis of literature data, validation of the text.

ORCID авторов / ORCID of authors

И.Р. Набиев / I.R. Nabiev: <https://orcid.org/0000-0002-8391-040X>
 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.М. Соколов / P.M. Sokolov: <https://orcid.org/0000-0001-5321-3753>
 А.В. Караулов / A.V. Karaulov: <https://orcid.org/0000-0002-1930-5424>

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 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Financing. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation through the grant № 075-15-2021-937.

Статья поступила: 31.07.2023. Принята в печать: 13.10.2023.

Article received: 31.07.2023. Accepted for publication: 13.10.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-17-27>

Принципы и подходы к созданию флуоресцентных гидрогелей для диагностики онкологических заболеваний

П.М. Соколов^{1,2}, П.С. Самохвалов^{1,2}, Д.А. Баранова², А.В. Суханова³

¹ЛИФТ (Life Improvement by Future Technologies) Центр; Россия, 121205 Москва, Сколково, ул. Нобеля, 5;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»; Россия, 115409 Москва, Каширское шоссе, 31;

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

Контакты: Павел Михайлович Соколов socolovpm87@mail.ru

Введение. Ранняя чувствительная и высокоспецифичная диагностика является одной из важных составляющих успешной терапии онкологических заболеваний. Флуоресцентные гидрогели позволяют создавать универсальные биосенсоры благодаря повышенной емкости связывания биологических распознающих и репортерных молекул, возможности проведения высокочувствительной флуоресцентной детекции, а также гибкости комбинирования их структурных и функциональных элементов.

Цель исследования – рассмотреть принципы дизайна и методические подходы к созданию биосенсоров на основе флуоресцентных гидрогелей для детекции онкомаркеров, а также обобщить и систематизировать данные по применяемым в них принципам детекции и генерации детектируемого сигнала.

Результаты. Флуоресцентные гидрогели являются примером трехмерных сенсорных платформ – структур, объединяющих репортерную флуоресцентную функцию с биологическими распознающими молекулами, которые позволяют сохранить уникальные оптические свойства флуоресцентных нанокристаллов на макроуровне. Пористая структура гидрогелей позволяет увеличить активную площадь поверхности биосенсоров для трехмерной иммобилизации флуоресцентных меток и биологических распознающих молекул, при этом сохраняя структуру последних для специфического связывания детектируемых молекул образца, что обеспечивает чувствительность, превосходящую традиционные методы иммуноферментного и иммунохроматографического анализа. В качестве биологических распознающих молекул могут выступать не только традиционно применяемые антитела, но и ферменты и гликопротеины, аптамеры и олигонуклеотиды, а также полимеры, полученные методом молекулярного импринтинга, что расширяет круг специфически детектируемых аналитов.

Заключение. В обзоре представлены примеры биосенсоров на основе флуоресцентных гидрогелей для детекции маркеров онкологических заболеваний, изложены подходы к получению этих гелей, иммобилизации биологических распознающих молекул и принципы генерации оптического детектируемого сигнала. Показаны основные преимущества флуоресцентных гидрогелевых биосенсоров перед классическими тестами, применяемыми в области экспресс-диагностики онкологических заболеваний.

Ключевые слова: флуоресцентные гидрогели, онкологические маркеры, флуоресцентные нанокристаллы, процесс гелеобразования, биосенсинг

Для цитирования: Соколов П. М., Самохвалов П. С., Баранова Д. А., Суханова А. В. Принципы и подходы к созданию флуоресцентных гидрогелей для диагностики онкологических заболеваний. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(4):17–27. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-17-27>

Principles and approaches in the development of fluorescent hydrogels for cancer diagnosis

Pavel M. Sokolov^{1,2}, Pavel S. Samokhvalov^{1,2}, Daria A. Baranova², Alyona V. Sukhanova³

¹Life Improvement by Future Technologies (LIFT) Center; 5 Nobelya St., Skolkovo, 121205 Moscow, Russia;

²National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute); 31 Kashirskoe Shosse, 115409 Moscow, Russia;

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

Contacts: Pavel Mikhailovich Sokolov socolovpm87@mail.ru

Introduction. Early sensitive and highly specific diagnosis is crucial for successful cancer therapy. The use of fluorescent hydrogels (FHG) makes it possible to develop versatile biosensors due to the increased binding capacity of biological capture and reporter molecules, sensitive fluorescence detection, and the flexibility of combining their structural and functional elements.

Aim. Analyzing the principles of designing biosensors based on FHG for the detection of cancer markers and the methodological approaches to their development, as well as summarizing and systematizing the data on the principles of detection and target signal generation used in these sensors.

Results. FHG represent 3D sensing platforms, i. e., structures that combine the reporter fluorescence function with biological capture molecules, allowing the unique optical properties of fluorescent nanocrystals at the macro level to be preserved. The porous structure of hydrogels increases the active surface area of biosensors for 3D immobilization of fluorescent labels and biological capture molecules, while preserving the structure of these molecules, which ensures specific binding of the detected molecules of the sample. This ensures a higher sensitivity compared with the traditional methods of immunoenzymatic and immunochromatographic analyses. Not only the traditionally used antibodies, but also enzymes and glycoproteins, aptamers and oligonucleotides, as well as polymers obtained by molecular imprinting, can serve as biological capture molecules, which extends the range of specifically detectable analytes.

Conclusion. The review presents examples of biosensors based on FHG intended for the detection of cancer markers and describes approaches to the preparation of FHG and immobilization of biological capture molecules, as well as principles of generation of the detected optical signal. The main advantages of fluorescent hydrogel biosensors over the classical tests used for quick diagnosis of cancer are shown.

Keywords: fluorescent hydrogels, cancer markers, fluorescent nanocrystals, gel formation, biosensing

For citation: Sokolov P.M., Samokhvalov P.S., Baranova D.A., Sukhanova A.V. Principles and approaches in the development of fluorescent hydrogels for cancer diagnosis. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2023;22(4):17–27. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-17-27>

Введение

Подходы к снижению смертности от злокачественных новообразований включают ранний низкоинвазивный скрининг и разработку и внедрение методов терапии онкологических заболеваний (ОЗ). Ранняя диагностика обеспечивает при прочих равных условиях более высокую выживаемость. Так, пациенты с раком предстательной железы (РПЖ) при его обнаружении на I стадии имеют практически 100 % 1-летнюю выживаемость, в то время как при обнаружении его на более поздних стадиях выживаемость падает до 87,6 %; в случае колоректального рака при его обнаружении на I или IV стадии выживаемость снижается с 97,7 до 43,9 % соответственно, а в случае рака легкого выживаемость на аналогичных стадиях снижается с 87,3 до 18,7 % [1]. Однако до 1/2 всех ОЗ диагностируются только на поздних стадиях [2].

Диагностика ОЗ представлена методами визуализации опухолей, такими как ультразвуковая диагностика, компьютерная, позитронно-эмиссионная, магнитная и другие виды томографий, а также методами молекулярной диагностики, включая секвенирование, жидкостную биопсию, иммуногистохимию, методы иммуноферментного анализа и многие др. [3]. Первая группа методов позволяет детектировать опухоли размером от нескольких миллиметров, а также устанавливать их локализацию, но при этом требуют использования дорогостоящего оборудования и применяются для скрининга только отдельных типов ОЗ. В то же время методы молекулярной диагностики позволяют детектировать даже единичные

раковые клетки [4]. В частности, А.М. Lutz и соавт. на основе реальных клинических данных создали математическую модель, позволяющую оценивать минимальный объем опухоли, которую можно детектировать по сывороточным маркерам CA125 (опухольный антиген CA125) и PSA (простатоспецифический антиген) [5]. В результате установлено, что существующие тест-системы по выявлению сывороточных онкомаркеров (ОМ) способны диагностировать опухоли на самых начальных стадиях, когда их размер составляет от 0,21 мм³ для PSA и от 0,11 мм³ — для CA125.

Чувствительность методов молекулярной диагностики при детекции биомаркеров обусловлена качеством применяемых аффинных меток, например антител, а также репортерных меток, применяемых для генерации детектируемого сигнала, в качестве которых выступают ферменты и хромогенные или флуоресцентные красители (ФК). Традиционно применяемые тест-системы для экспресс-диагностики представлены системами иммуноферментного анализа или иммунохроматографического анализа, в которых для детекции применяют пары антител, одно из которых служит для связывания аналита, а второе конъюгировано с метками для детекции, в качестве которых чаще всего выступают пероксидаза хрена и наночастицы коллоидного золота либо органические ФК. При этом связывающие антитела иммобилизуют на поверхности лунок планшета, выполненного из полистирола или поливинилхлорида, или на нитроцеллюлозной мембране, что ограничивает объем

сенсорной области, по сравнению с системами, в которых взаимодействие аналитов с аффинными метками происходит в 3 измерениях. Примером таких тест-систем с трехмерной сенсорной областью являются флуоресцентные гидрогели (ФГГ). Известно, что флуоресцентная детекция является самой чувствительной в сравнении с другими оптическими методами детекции [6], а выбор оптимального типа флуоресцентных меток (ФМ), например органических красителей, флуоресцентных белков (ФБ) или флуоресцентных нанокристаллов (ФНК), зависит от конкретных задач. Использование трехмерной структуры пористого гидрогеля (ГГ) позволяет увеличить эффективный объем взаимодействия, а значит, и количество детектируемых ОМ, детектирующих аффинных молекул и генерирующих детектируемый сигнал ФМ, что повышает чувствительность диагностики.

Флуоресцентные гидрогели представляют собой полимерные структуры, стабилизируемые ковалентными, гидрофобными, водородными или статическими связями [7], в которые внедрены ФМ, или структуры, образованные из коллоидных нанокристаллов (НК) за счет фазового перехода «золь–гель» [8]. Гидрогели обладают разветвленной структурой, которая подходит для иммобилизации аффинных, флуоресцентных и других меток и вспомогательных элементов, и обладает гидрофильностью и пористостью, необходимыми для проникания в гидрогели исследуемых аналитов. В большинстве случаев для специфического распознавания аналита используют функционализацию ГГ аффинными метками, а также особенности самой структуры или материала ГГ [9]. Для генерации детектирующего сигнала в гидрогеле могут быть использованы особенности свойств материалов ГГ, способных растворяться или набухать при изменении рН [10], или применение оптических меток, генерирующих флуоресцентный [11] или хромогенный [12] сигналы, либо соединений, способных изменять свои электрохимические [13] или электропроводные [14] свойства. Далее мы рассмотрим подходы к созданию ФГГ и принципы применений биосенсоров на их основе для детекции ОМ и метаболитов при ОЗ.

Свойства флуоресцентных гидрогелей и способы их формирования

Применение трехмерных полимерных ГГ в качестве матриц для детекции изучаемых взаимодействий позволяет не только перейти от двумерной модели детекции к трехмерной, что позволяет увеличить емкость связывания флуоресцентных и аффинных меток, но и обеспечивает лучшее сохранение структуры биологических молекул. Действительно, иммобилизация биомолекул на плоских поверхностях часто приводит к их денатурации [15], тогда как использо-

вание для иммобилизации распознающих молекул 3D-матриц позволяет сохранить их специфичность и чувствительность, необходимые для связывания детектируемых аналитов [16]. Эти факторы позволяют увеличить чувствительность детекции для биосенсоров на основе ФГГ, по сравнению с их аналогами, где иммобилизация биологических распознающих и вспомогательных молекул происходит на пластиковой подложке или нитроцеллюлозной мембране. При иммобилизации распознающих меток в трехмерной структуре ГГ их пространственная ориентация становится неважна, так как исследуемый аналит в любом случае будет проходить со всех сторон от них, что увеличивает чувствительность его детекции. Так, Y. Gao и соавт. продемонстрировали, что эффективность гибридизации ДНК на поверхности в 20–40 раз ниже, чем в растворе [17]. При иммобилизации антител на плоской поверхности они также теряют аффинность и специфичность связывания своих антигенов, многочисленные примеры этого приведены в обзоре N.G. Welch и соавт. [18] – с одной стороны. С другой стороны, В. Feng и соавт. показали, что при реализации трехмерной организации антител даже на плоской поверхности можно добиться повышения чувствительности детекции в 64 раза [19]. Вместе с тем в качестве биологических распознающих молекул могут быть использованы как традиционно применяемые для этого антитела, так и, как мы увидим далее, ферменты, молекулы нуклеиновых кислот и другие биомолекулы. Поскольку физиологической средой для биологических молекул являются биологические жидкости, то логичным требованием к биосенсорам является гидрофильность их активной сенсорной зоны. Гидрогели представляют собой сеть сшитых между собой гидрофильных полимеров, которые нерастворимы в воде, а также могут сохранять свои физико-химические свойства при дегидратации и последующем погружении в водную среду [20]. Важно, что это их свойство может быть использовано при производстве биосенсоров, которые для увеличения срока хранения могут выпускаться в дегидратированном виде.

Один из основных компонентов ФГГ – ФМ, которые и придают им флуоресцентные свойства. В качестве таких меток могут быть использованы органические ФК [21], ФБ и пептиды [22], ароматические углеводороды [23], металлические наночастицы [24], а также квантовые точки (КвТ) и другие НК [25]. Основные требования к ФМ заключаются в возможности мультиплексной детекции, высокой интенсивности флуоресцентного сигнала (ФС), фотостабильности, а также возможности надежной и удобной иммобилизации ФМ внутри ГГ. Для мультиплексной детекции необходимо, чтобы были доступны ФМ с различными спектрами флуоресценции, а также

чтобы спектры поглощения красителей разных цветов совпадали или перекрывались, что позволило бы проводить их одновременное возбуждение одним источником излучения с заданной длиной волны. Органические ФК и ФБ представлены множеством различных цветов во всем диапазоне от видимой до ближней инфракрасной области спектра. Однако в сравнении с ФНК они обладают большей шириной спектров флуоресценции и меньшей шириной спектров поглощения, что затрудняет одновременное возбуждение и детекцию ФС [26]. Флуоресцентные НК — это полупроводниковые структуры размером порядка единиц, иногда десятков нанометров, а их оптические свойства, такие как спектр флуоресценции и поглощения, зависят от их размера, структуры и состава. Ядра НК чаще всего представлены элементами III–V, II–VI или IV–VI групп периодической системы и могут содержать верхнюю эпитаксиальную неорганическую оболочку, которая улучшает оптические свойства и делает НК более устойчивыми к факторам внешней среды [27]. Покрытие НК эпитаксиальной оболочкой из широкозонных материалов ZnS или CdS снижает рекомбинацию пар носителей заряда на поверхностных дефектах ядра и подавляет снижение квантового выхода флуоресценции. В зависимости от состава НК различаются не только их оптические свойства, но также и их потенциальная токсичность, которая в случае с НК состава CdSe, CdTe (элементы II–VI групп) или PbS, PbSe (элементы IV–VI групп) достаточно высока из-за применения тяжелых металлов, которые вредны не только в процессе изготовления и использования, но также представляют значительную проблему при их утилизации. НК InP (элементы III–V групп), хотя и не содержат тяжелых металлов, но обладают худшими оптическими свойствами по сравнению с токсичными аналогами [28]. Безопасной альтернативой являются тройные НК, ядро которых состоит из 3 элементов I–III–VI групп, например состава CuInS₂ (CIS) или AgInS₂ (AIS). Для улучшения квантового выхода на поверхность НК CIS и AIS наносят эпитаксиальные оболочки состава ZnS или ZnS_x/Se_{1-x}, что снижает рекомбинацию зарядов на поверхности ядер и увеличивает квантовый выход флуоресценции [29]. Флуоресцентные НК обладают размером менее боровского радиуса для выбранного материала, благодаря чему в них проявляется эффект размерного квантования, что позволяет подстраивать спектры флуоресценции под конкретные задачи выбором их размера [30]. Фотостабильность, то есть сохранение флуоресцентных свойств при облучении светом, у НК выше, чем у органических ФК [31], что позволяет проводить длительное накопление сигнала для повышения чувствительности, а также осуществлять продолжительную детекцию, например, при ис-

следовании длительных процессов или нескольких последовательных образцов, не опасаясь снижения уровня ФС со временем.

В зависимости от типа флуоресцентной метки, ФГГ на их основе могут быть получены различными путями. Например, ФБ или органические ФК могут быть внедрены в уже готовые ГГ (рис. 1, а) [32]. ФГГ на основе НК также могут быть получены путем пост-синтетического внедрения НК в ГГ. Например, С.У. Li и соавт. использовали подобный способ для внедрения углеродных КвТ в гели из полиметакриловой кислоты, а иммобилизацию в гидрогеле проводили за счет образования водородных связей между аминогруппами оболочки КвТ и карбоксильными группами полимера, из которого состоял ГГ [33]. Также внедрение ФМ может быть проведено в ходе полимеризации ГГ (рис. 1, б). В этом случае, как показано в работе J. Xu и соавт. [34], поверхность НК может быть функционализирована химическими соединениями, которые вызывают полимеризацию метилметакрилата или глицидилметакрилата и могут выступать в качестве сшивок для мономеров. В другой работе T. Yang и соавт. описали полимеризацию ФГГ на основе акриловой кислоты и акриламида с НК состава CdS с использованием гамма-излучения в качестве инициатора полимеризации [35]. Стоит отметить, что оба указанных способа требуют дополнительных процедур для получения равномерного распределения ФМ во всем объеме, например обработки ультразвуком [36]. Формирование ФГГ также возможно в процессе фазового перехода «золь–гель» (рис. 1, в). Например, N. Garonik и соавт. описали возможность гелеобразования для НК состава CdTe, поверхность которых функционализирована соединениями, содержащими тиольные группы [37]. M. Hörner и соавт. описали ГГ на основе производных полиэтиленгликоля с внедренным в него ФБ mCherry, который получили в процессе фазового перехода «золь–гель» [38].

Детекция аналитов с помощью ФГГ

Детекция аналитов с помощью ФГГ основана на детекции изменений их оптических свойств, которые связаны либо с тушением флуоресценции оптических меток, либо с появлением новых ФС (рис. 2). Вместе с тем благодаря гибкости структуры и состава ФГГ существует множество механизмов, вызывающих тушение или изменение спектров флуоресценции. Тушение флуоресценции, как правило, основано на переносе энергии от ФМ к неизлучающим компонентам, например по механизму ферстеровского резонансного переноса энергии, а изменения в спектре связаны с активацией новых ФМ, в том числе и по указанному механизму. Стоит отметить, что тушение флуоресценции также возможно за счет дегградации НК или за счет дегградации структуры ГГ,

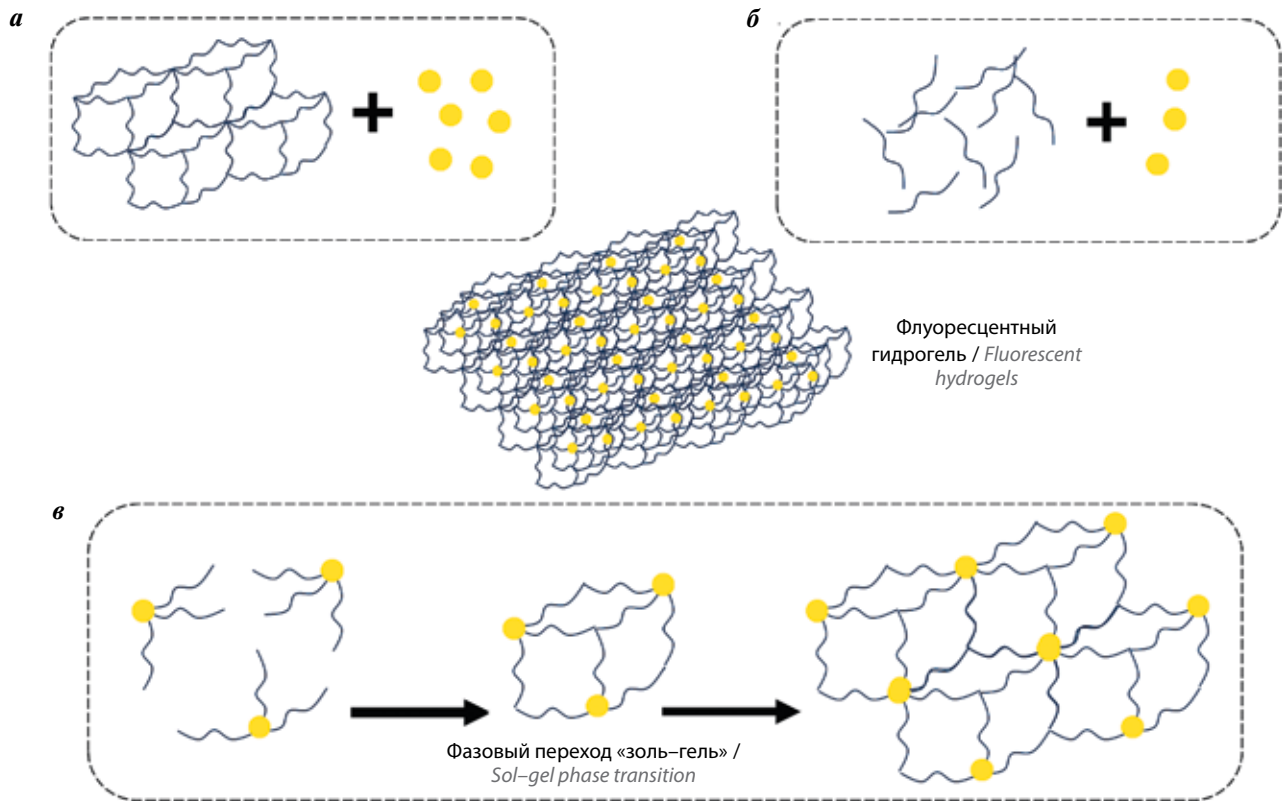


Рис. 1. Способы получения флуоресцентных гидрогелей: а – внедрение флуоресцентных меток (ФМ) в готовый гидрогель (ГГ); б – внедрение ФМ в ГГ на этапе его полимеризации; в – внедрение ФМ в ГГ в ходе фазового перехода «золь–гель». Желтый круг – флуоресцентная метка; синяя линия – мономер для синтеза ГГ

Fig. 1. Methods of obtaining fluorescent hydrogels: a – the introduction of fluorescent labels into the polymerized hydrogel; b – introduction of fluorescent labels into the hydrogel at the stage of its polymerization; c – incorporation of fluorescent labels into the hydrogel during the sol–gel phase transition. Yellow circle – fluorescent label; blue line – monomer for hydrogel synthesis

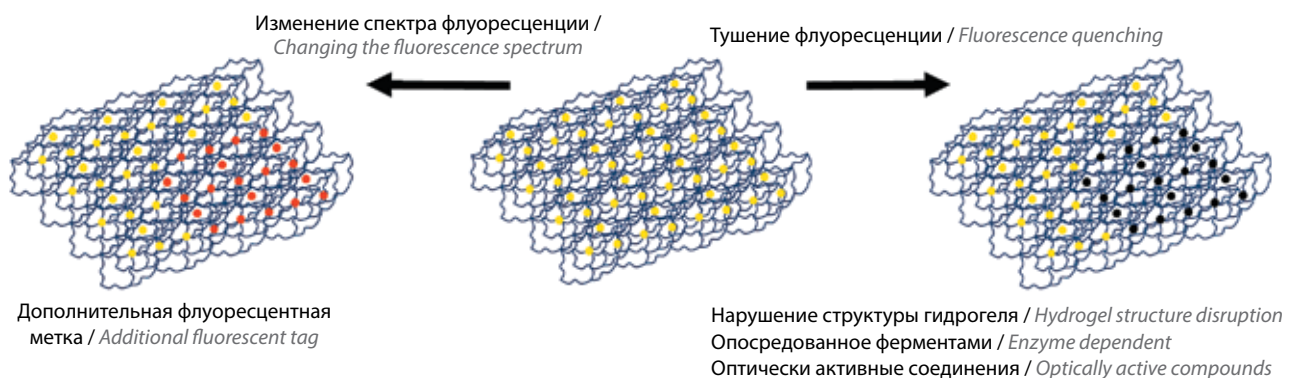


Рис. 2. Пути изменения оптических свойств флуоресцентных гидрогелей

Fig. 2. Ways to change the optical properties of fluorescent hydrogel

приводящей к агрегации НК и снижению их флуоресценции [39].

Раковый антиген СА19–9 является одним из скрининговых маркеров, которые применяются при диагностировании рака поджелудочной железы (РПЖЖ) и одобрены Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств

(FDA) США с 2002 г. [40]. А.М.Л. Piloto и соавт. создали биосенсор на основе целлюлозного ГГ и НК состава CdTe для детекции СА19–9 [41]. В качестве аффинных меток, селективно связывающих СА19–9, использовали полимер, полученный методом молекулярного импринтинга, которым затем покрывали НК, а их, в свою очередь, включали в целлюлозный

ГГ. В результате при контакте с ГГ CA19–9 селективно связывался с полимером на поверхности НК, вызывая снижение их флуоресценции. Авторами показано, что применение ГГ позволило повысить стабильность полимера, полученного методом молекулярного импринтинга, а также достичь чувствительности детекции до $1,58 \times 10^{-3}$ Ед/мл. В результате была продемонстрирована детекция CA19–9 в образцах сыворотки в диапазоне от $2,76 \times 10^{-2}$ до $5,23 \times 10^2$ Ед/мл с высокой специфичностью и селективностью, что хорошо коррелирует с пороговым значением концентрации CA19–9 при диагностике РПЖЖ, которое составляет порядка 23 Ед/мл.

Е. Ahmadi-Sangachin и соавт. описали биосенсор на основе ФГГ, состоящего из молекул одноцепочечной ДНК (оцДНК) в качестве материала ГГ и нанокластеров серебра в качестве ФМ для детекции PSA, который является одним из традиционно измеряемых ОМ при диагностике РПЖ [42]. Представлено, что ГГ образован из двух видов структур: Y-образных ДНК (Y-ДНК), состоящих из 3 частично комплементарных оцДНК, и линкерных ДНК (Л-ДНК) структур, состоящих из аптамера, селективно связывающего PSA, и комплементарного аптамеру участка оцДНК. В отсутствие PSA оцДНК образовывали стабильный ГГ за счет комплементарных взаимодействий между участками Y-ДНК и Л-ДНК структур. К полученному таким способом ГГ добавляли раствор AgNO_3 и NaBH_4 , что приводило к формированию нанокластеров серебра в петлевых доменах Y-ДНК структур и придавало ГГ флуоресцентные свойства. Для определения PSA чистый белок добавляли в раствор Л-ДНК структур, а затем полученную смесь добавляли в раствор Y-ДНК структур с нанокластерами серебра. В результате специфического связывания аптамера с PSA нарушается образование Л-ДНК структур, что нарушает формирование ГГ и приводит к его агрегации и снижению интенсивности флуоресценции. Авторам удалось детектировать PSA в диапазоне от 0,05 до 8 нг/мл с чувствительностью детекции до 4,4 пг/мл, в том числе в образцах сыворотки крови. Следует отметить простоту проведения анализа и низкую стоимость изготовления биосенсора, что свидетельствует о высоком потенциале предлагаемой разработки.

Развитие методов секвенирования и высокочувствительной детекции ДНК и РНК привело к тому, что они все чаще стали применяться для диагностики ОЗ, и уже создаются биосенсоры на основе ФГГ для детекции нуклеиновых кислот. МикроРНК (мкРНК) регулируют экспрессию множества генов на посттрансляционном уровне. Например, мкРНК-21 ассоциирована с раком молочной железы (РМЖ), раком легких и РПЖ, а также множеством других ОЗ и является одной из первых обнаруженных мкРНК,

которая регулирует гены супрессоров опухоли, связанные с пролиферацией, апоптозом и инвазией. Ознакомиться с ролью мкРНК-21 в качестве биомаркера ОЗ можно в обзоре D. Bautista-Sánchez и соавт. [43]. S. Mohammadi и соавт. в работе описали создание биосенсора на основе ФГГ из хитозана и углеродных КвТ для детекции мкРНК-21 [44]. Для этого из хитозана, содержащего $-\text{NH}_2/-\text{OH}$ группы, углеродных КвТ, содержащих $-\text{CONH}$ группы, и этилендиаминтетрауксусной кислоты, содержащей $-\text{COOH}$ группы, был получен ФГГ, стабилизированный водородными связями, обработан ультразвуком до полного разрушения ГГ, после чего к нему был добавлен функционализированный амином оцДНК-зонд. Связывание мкРНК-21 с ДНК-зондом на поверхности углеродных КвТ приводит к реорганизации структуры получаемого ГГ, в результате чего происходила частичная агрегация КвТ и снижение флуоресценции ГГ. В экспериментах с чистой мкРНК-21 удалось добиться линейного диапазона детекции при концентрациях мкРНК-21 в диапазоне от 0,1 до 125 фМ и лимита детекции в 0,03 фМ. Между тем неспецифического снижения флуоресценции при использовании мкРНК всего с одной нуклеотидной заменой в последовательности не было обнаружено. Эксперименты по детекции клеток линии РМЖ MCF-7, экспрессирующих мкРНК-21, показали, что раковые клетки могут быть детектированы при концентрации от 310 клеток/мл.

Еще одним представителем мкРНК, ассоциированной с различными видами ОЗ, является мкРНК-141. Так, изменение уровня экспрессии мкРНК-141 наблюдается при многих видах рака; в частности, при раке яичников, РПЖ, щитовидной железы и мочевого пузыря наблюдается повышенная экспрессия мкРНК-141, а при раке желудка, РПЖЖ и РПЖ экспрессия мкРНК-141, наоборот, снижена [45]. С. Li и соавт. сконструировали биосенсор на основе ГГ, состоящего из ДНК, функционализированной интеркалирующим красителем SYBR Green I, или НК состава CdTe, конъюгированными с ДНК зондами, для детекции мкРНК-141 [46]. Для получения ГГ они использовали ДНК с акридитом на 5'-конце, который содержит метакриловую группу и позволяет включать ДНК в структуру акриламидных гелей. Для детекции целевой мкРНК-141 была использована гибридизационная цепная реакция в комбинации с технологией амплификации ДНК – DNA walker, которая при обнаружении целевой нуклеотидной последовательности позволяет резко увеличить количество двухцепочечной ДНК в смеси. Применение структуры ГГ позволяет повысить стабильность применяемых ДНК-зондов и многократно увеличить емкость связывания исследуемых молекул РНК и ФМ, что позволяет достичь чувствительности детекции на уровне 10^{-4} фМ, это на 2–4 порядка превосходит

чувствительность детекции с помощью других методов каскадной амплификации РНК с флуоресцентной детекцией [47].

Фолатный рецептор служит для транспорта внутрь клеток фолата (витамина B_9), играющего активную роль в эпигенетической регуляции, синтезе нуклеиновых кислот, делении и росте клетки, поэтому опухолевые клетки требуют большого количества фолата. G. Zhang и соавт. использовали ФГГ, включающий конъюгаты НК с фолиевой кислотой, для детекции раковых клеток, на поверхности которых оверэкспрессирован фолатный рецептор [48]. Предел детекции с помощью сконструированного ими биосенсора составил порядка 10^4 клеток/мл в случае с клеточными линиями MCF-7 (РМЖ) и HeLa (рак шейки матки). При этом неспецифического сигнала на клеточных линиях A549 (рак легких) и 3T3 (фибробласты мыши), которые не экспрессируют фолатный рецептор, не обнаружено.

Фермент лакказы обладает противоопухолевой активностью против клеток РМЖ, предотвращая связывание 17β -эстрадиола с эстрогеновым рецептором и блокируя миграцию и инвазию раковых клеток [49]. С. Ruiz-Palomego и соавт. описали создание ФГГ для детекции лакказы, чувствительность которого не зависит от их ферментативной активности [50]. Для этого они синтезировали ФГГ из наноцеллюлозы и КвТ из графена, дополнительно легированных серой и азотом для придания им необходимых оптических свойств. Лакказы, взаимодействуя с графеновыми слоями, стабилизированными наноцеллюлозой, вызывает перенос энергии и тушение флуоресценции КвТ, что позволяет детектировать изменение сигнала при концентрации лакказы всего 0,048 Ед/мл.

Спермин является маркером нарушения биохимических процессов, ассоциированных со злокачественными опухолями, и имеет диагностический потенциал для детекции рака на ранних стадиях [51]. R. R. Nair и соавт. в работе описали высокоселективный биосенсор спермина/спермидина на основе ГГ с синтезированным ими ФК – 3-((7-гидрокси-4-метилкумарин) метил) аминифенилбороновой кислотой (КБ) [52]. Для получения ФГГ краситель КБ был растворен в буфере, прогрет до 90°C , при постоянном перемешивании к нему была добавлена агароза, а после ее полного растворения смесь охлаждали для формирования ГГ. При контакте КБ со спермином/спермидином происходило усиление флуоресценции КБ за счет снижения неизлучательного переноса фотовозбужденных электронов в КБ. В результате авторам удалось детектировать спермин в диапазоне концентраций от 6 мкМ до 2,5 мМ, в том числе и в образцах сыворотки крови и мочи.

Глутатион является важным регуляторным соединением клетки, участвует в активации ферментов,

регуляции экспрессии генов, передачи сигналов, а также является одним из самых распространенных клеточных антиоксидантов, помогая противостоять активным формам кислорода. Повышенный уровень глутатиона наблюдается во множестве раковых клеток, а пониженный его уровень способствует окислительному стрессу, связанному с прогрессией опухолей [53]. Оригинальный пример использования ФГГ для детекции глутатиона предложили R. Wu и соавт. [54], которые синтезировали ФГГ путем нагрева смеси аминированного полиакриламида и флуоресцеина, с последующим гидролизом гидроксидом натрия и промывкой этанолом и водой. Полученный ГГ помещали в стеклянную пипетку Пастера с закупоренным нижним концом и тонкими отверстиями по всей длине, которые позволяют проникать внутрь исследуемым анализам, но не пропускают частицы ФГГ. При добавлении Cu^{2+} объем ФГГ уменьшался, а добавление глутатиона приводило к конкурентному связыванию ионов Cu^{2+} и восстановлению объема ГГ и его флуоресцентных свойств. Полученный таким образом биосенсор позволяет детектировать глутатион в диапазоне от $2,0 \times 10^{-6}$ до $1,2 \times 10^{-4}$ моль/л и не чувствителен к таким соединениям, как аминокислоты, витамин С, дофамин и др.

Современные исследования показывают, что риск возникновения и развитие различных типов рака коррелируют с дофаминовым сигнальным путем и дофаминовыми рецепторами, и рассматривают их в качестве возможных путей противоопухолевой терапии [55]. Биосенсор на основе флуоресцентного ГГ для детекции дофамина может быть основан на его распознавании не с помощью традиционно применяемых антител, а на использовании фермента тирозиназы, которая катализирует его окисление до дофамин-о-хинона [56]. Для получения ФГГ авторы использовали НК состава CdTe, поверхность которых была функционализирована меркаптоантарной кислотой, в результате чего ФГГ формировался в ходе фазового перехода «золь–гель». Полученный ФГГ имел размер пор примерно 10–50 нм, что подходит для инкапсулирования в его структуре белковых молекул. Для внедрения тирозиназы ГГ был разрушен ультразвуком и смешан с тирозиназой, после чего структура ГГ была восстановлена для иммобилизации фермента в порах ГГ. При контакте полученного ФГГ с дофамином тирозиназа катализирует его окисление до дофамин-о-хинона, который гасит флуоресценцию НК CdTe. Сконструированный таким образом биосенсор обладает пределом обнаружения дофамина $5,0 \times 10^{-8}$ моль/л, и он подходит для определения дофамина в диапазоне от $5,0 \times 10^{-5}$ до $1,0 \times 10^{-3}$ моль/л.

Метаболические нарушения являются одной из возможных причин развития ОЗ, а гиперурикемия – одной из частых причин метаболических нарушений.

Повышенный уровень мочевой кислоты в крови коррелирует с общим уровнем воспаления и окислительным стрессом, а также может выступать проонкогенным фактором [57]. N. E. Azmi и соавт. разработали биосенсор на основе ФГГ для детекции мочевой кислоты в привычном формате 96-луночного планшета [58]. Для этого они использовали НК состава CdS, функционализированные меркаптопропионовою кислотой, которая позволяет получать на их основе ФГГ. При этом для формирования ГГ исполь-

зовали конъюгаты НК, ковалентно связанные с ферментом уриказой и пероксидазой хрена, полученные в ходе N-гидроксисульфосукцинимидной и 1-[3-(диметиламино)-пропил]3-этилкарбодиимидной реакций. Биосенсор получен путем смешивания компонентов ГГ: аминопропил-триметоксисилана, 3-глицидоксипропил-триметоксисилана и этанола, добавления конъюгат НК и ферментов и последующего раскапывания полученной смеси в 96-луночный планшет для формирования ГГ. При добавлении мо-

Биосенсоры на основе флуоресцентных гидрогелей для детекции онкомаркеров и метаболитов при онкологических заболеваниях

Biosensors based on fluorescent hydrogels for detection of cancer markers and metabolites associated with cancer

Аналит Analyte	Тип анализа Type of analyte	Диапазон измерения Measurement range	Лимит детекции Limit of detection	Ссылка Reference
CA19-9	Маркер, применяемый при диагностировании рака поджелудочной железы The marker used in the diagnosis of pancreatic cancer	$2,76 \times 10^{-2}$ $5,23 \times 10^2$ Ед/мл $5,23 \times 10^2$ U/ml	$1,58 \times 10^{-3}$ Ед/мл $1,58 \times 10^{-3}$ U/ml	[41]
PSA	Маркер, применяемый при диагностировании рака предстательной железы The marker used in the diagnosis of prostate cancer	0,05–8 нг/мл 0,05–8 ng/ml	4,4 пг/мл 4,4 pg/ml	[42]
мкРНК-21 miRNA-21	Маркер при раке молочной железы, предстательной железы, колоректальном раке и др. The marker of breast cancer, prostate cancer, colorectal cancer, etc.	0,1–125 фМ 0,1–125 fM	0,03 фМ 0,03 fM	[44]
мкРНК-141 miRNA-141	Маркер при раке молочной железы, желчного пузыря, предстательной железы и др. The marker of breast cancer, gallbladder cancer, prostate cancer, etc.	10–4 фМ – 10 пМ 10–4 fM – 10 pM	10^{-4} фМ 10^{-4} fM	[46]
Фолатный рецептор Folate receptor	Фолатный рецептор сверхэкспрессирован на поверхности некоторых типов раковых клеток, например при раке легкого, почек, молочной железы и яичников The folate receptor is overexpressed on the surface of some cancer cell, for example in lung, kidney, breast, and ovarian cancer cells	–	10^4 клеток/мл 10^4 cells/mL	[48]
Спермин Spermine	Маркер нарушения биохимических процессов, ассоциированных со злокачественными опухолями The marker of impaired biochemical processes, associated with malignant tumors	6 мкМ – 2,5 мМ 6 μ M – 2,5 mM	6 мкМ 6 μ M	[52]
Глутатион Glutathione	Повышенный уровень глутатиона наблюдается во множестве раковых клеток, а пониженный способствует окислительному стрессу, связанному с прогрессией опухолей Elevated glutathione level are found in many cancer cells, while decreased levels contribute to oxidative stress associated with tumor progression	$2,0–120 \times 10^{-6}$ моль/л $2,0–120 \times 10^{-6}$ mol/L	$2,0 \times 10^{-6}$ моль/л $2,0 \times 10^{-6}$ mol/L	[54]
Дофамин Dopamine	Дофаминовый сигнальный путь рассматривается как один из возможных путей противоопухолевой терапии The dopamine signaling pathway is considered as one of the possible pathway for antitumor therapy	$5,0–100 \times 10^{-5}$ моль/л $5,0–100 \times 10^{-5}$ mol/L	$5,0 \times 10^{-8}$ моль/л $5,0 \times 10^{-8}$ mol/L	[56]
Мочевая кислота Uric acid	Мочевая кислота является проонкогенным фактором The uric acid is a pro-oncogenic factor	60–2000 мкМ 60–2000 μ M	50 мкМ 50 μ M	[58]

чевой кислоты она окисляется уриказой с образованием перекиси водорода, которая затем окисляется пероксидазой хрена до кислорода и вызывает тушение флуоресценции НК. Работоспособность сконструированного биосенсора проверена на клинических образцах мочи без ее предварительной пробоподготовки и показала, что он позволяет детектировать мочевую кислоту с чувствительностью до 50 мкМ в диапазоне от 60 до 2000 мкМ.

Еще одним из развивающихся направлений в диагностике ОЗ на ранних стадиях является исследование нетипичного гликозилирования белков [59]. Y. Koshi и соавт. разработали 6 различных ФГГ, каждый на основе одного из лектинов, флуоресцентно меченных флуоресцеином, обладающих специфичностью к связыванию различных углеводов [60]. Перед анализом к ФГГ добавляли специфичные к данному лектину молекулы гасителей флуоресценции, что приводило к снижению общего ФС, конъюгированного с лектином флуоресцеина, причем добавление исследуемых образцов, содержащих белки, гликозилированные сахарами, которые имеют большее сродство к лектинам, вызывало высвобождение гасителя и увеличение ФС. С помощью созданного биосенсора исследованы различные гликопротеины, а также клеточные раковые линии. Полученные данные позволили провести исследования уникальных профилей гликозилирования и типирование различных клеток для определения уровня их клеточной адгезии и межклеточного сигналинга. При этом оказалось, что чувствительность детекции может быть подстроена под конкретные задачи путем варьирования количества молекул гасителя флуоресценции, а типичные лимиты детекции с помощью сконструированного биосенсора достигали 1 мМ для глюкозы и 30 мкМ — для гликопротеина Ribo В.

Несмотря на то что биосенсоры на основе ФГГ являются сравнительно новой разработкой, уже су-

ществует множество примеров их использования для детекции ОМ и метаболитов, связанных с развитием различных ОЗ (см. таблицу).

Заключение

Флуоресцентные гидрогели и биосенсоры на их основе позволяют детектировать аналиты в более удобном формате с высокой чувствительностью. Гидрогели позволяют иммобилизовать большее количество распознающих молекул, сохранить их структуру, а также ориентировать все участки связывания аналита в сторону раствора, что обеспечивает максимальную специфичность и чувствительность детекции. Кроме того, использование ФС позволяет повысить чувствительность детекции аналитов по сравнению с методами хромогенной окраски, традиционно применяемыми в системах иммуноферментного анализа и иммунохроматографического анализа. Поскольку изменение уровня ФС в большинстве случаев обратимо, то биосенсоры на основе ФГГ могут использоваться несколько раз для анализа различных образцов, что снижает издержки на проведение анализа. Применение в ГГ в качестве ФМ НК КвТ обеспечивает повышение чувствительности и стабильности биосенсоров.

Сегодня биосенсоры на основе ФГГ используются для детекции ОМ и метаболитов, связанных с развитием различных ОЗ. На основе ФГГ действуют биосенсоры, работающие в проточном режиме, например, при их интегрировании в микрофлюидные устройства, в классическом формате 96-луночного планшета, совместимые с флуоресцентными ридерами, или в формате сенсорных микроволокон. Существует также множество примеров ФГГ-биосенсоров для детекции ионов металлов, антибиотиков и бактерий, а расширение спектра детектируемых аналитов и внедрение биосенсоров на основе ГГ в клиническую практику является вопросом ближайшего будущего.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Hawkes N. Cancer survival data emphasise importance of early diagnosis. *BMJ* 2019;364:1408. DOI: 10.1136/bmj.1408
- Crosby D., Bhatia S., Brindle K.M. et al. Early detection of cancer. *Science* 2022;375(6586):eaay9040. DOI: 10.1126/science.aay9040
- Pulumati A., Pulumati A., Dwarakanath B.S. et al. Technological advancements in cancer diagnostics: Improvements and limitations. *Cancer Rep (Hoboken)* 2023;6(2):e1764. DOI: 10.1002/cnr2.1764
- 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. *Methods Mol Biol* 2021;2350:105–23. DOI: 10.1007/978-1-0716-1593-5_8
- Lutz A.M., Willmann J.K., Cochran F.V. et al. Cancer screening: a mathematical model relating secreted blood biomarker levels to tumor sizes. *PLoS medicine* 2008;5(8):e170. DOI: 10.1371/journal.pmed.0050170
- You P.Y., Li F.C., Liu M.H., Chan Y.H. Colorimetric and fluorescent dual-mode immunoassay based on plasmon-enhanced fluorescence of polymer dots for detection of PSA in whole blood. *ACS Appl Mater Interfaces* 2019;11(10):9841–9. DOI: 10.1021/acsami.9b00204
- Li Y., Huang Z.-Z., Weng Y., Tan H. Pyrophosphate ion-responsive alginate hydrogel as an effective fluorescent sensing platform for alkaline phosphatase detection. *Chem Commun (Camb)* 2019;55(76):11450–3. DOI: 10.1039/C9CC05223B

8. Guglielmi M., Martucci A. Semiconductor quantum dot-doped sol–gel materials. In: Martucci A., Santos L., Estefanía Rojas Hernández R., Almeida R., eds. Sol–gel derived optical and photonic materials. Cambridge: Woodhead Publishing, 2020. P. 209–226.
9. Richter A., Paschew G., Klatt S. et al. Review on hydrogel-based pH sensors and microsensors. *Sensors (Basel)* 2008;8(1):561–81. DOI: 10.3390/s8010561
10. Zhang Z., He C., Chen X. Hydrogels based on pH-responsive reversible carbon–nitrogen double-bond linkages for biomedical applications. *Mat Chem Front* 2018;2:1765–78. DOI: 10.1039/C8QM00317C
11. Hashim H., Maruyama H., Akita Y. et al. Hydrogel fluorescence microsensor with fluorescence recovery for prolonged stable temperature measurements. *Sensors (Basel)* 2019;19(23):5247. DOI: 10.3390/s19235247
12. Jia Z., Sukker I., Müller M., Schönherr H. Selective discrimination of key enzymes of pathogenic and nonpathogenic bacteria on autonomously reporting shape-encoded hydrogel patterns. *ACS Appl Mater Interfaces* 2018;10(6):5175–84. DOI: 10.1021/acsami.7b15147
13. Liang Z., Zhang J., Wu C. et al. Flexible and self-healing electrochemical hydrogel sensor with high efficiency toward glucose monitoring. *Biosens Bioelectron* 2020;155:112105. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112105
14. Chen Z., Chen Y., Hedenqvist M.S. et al. Multifunctional conductive hydrogels and their applications as smart wearable devices. *J Mater Chem B* 2021;9(11):2561–83. DOI: 10.1039/D0TB02929G
15. Larsson A., Ekblad T., Andersson O., Liedberg B. Photografted poly(ethylene glycol) matrix for affinity interaction studies. *Biomacromolecules* 2007;8(1):287–95. DOI: 10.1021/bm060685g
16. Jung I.Y., Kim J.S., Choi B.R. et al. Hydrogel based biosensors for *in vitro* diagnostics of biochemicals, proteins, and genes. *Adv Healthc Mater* 2017;6(12):1601475. DOI: 10.1002/adhm.201601475
17. Gao Y., Wolf L.K., Georgiadis R.M. Secondary structure effects on DNA hybridization kinetics: A solution *versus* surface comparison. *Nucleic Acids Res* 2006;34(11):3370–7. DOI: 10.1093/nar/gkl422
18. Welch N.G., Scoble J.A., Muir B.W., Pigram P.J. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review). *Biointerphases* 2017;12(2):02D301. DOI: 10.1116/1.4978435
19. Feng B., Huang S., Ge F. et al. 3D antibody immobilization on a planar matrix surface. *Biosens Bioelectron* 2011;28(1):91–6. DOI: 10.1016/j.bios.2011.07.003
20. Su X., Hao D., Xu X. et al. Hydrophilic/hydrophobic heterogeneity anti-biofouling hydrogels with well-regulated rehydration. *ACS Appl Mater Interfaces* 2020;12(22):25316–23. DOI: 10.1021/acsami.0c05406
21. Missirlis D., Baños M., Lussier F., Spatz J.P. Facile and versatile method for micropatterning poly(acrylamide) hydrogels using photocleavable comonomers. *ACS Appl Mater Interfaces* 2022;14(3):3643–52. DOI: 10.1021/acsami.1c17901
22. Xia Y., Xue B., Qin M. et al. Printable fluorescent hydrogels based on Self-assembling peptides. *Sci Rep* 2017;7(1):9691. DOI: 10.1038/s41598-017-10162-y
23. Kar T., Patra N. Pyrene-based fluorescent supramolecular hydrogel: Scaffold for nanoparticle synthesis. *J Phys Org Chem* 2019;33:e4026. DOI: 10.1002/poc.4026
24. Wu Y., Jin X., Ashrafzadeh Afshar E. et al. Simple turn-off fluorescence sensor for determination of raloxifene using gold nanoparticles stabilized by chitosan hydrogel. *Chemosphere* 2022;305:135392. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.135392
25. Liu C., Li Q., Wang H. et al. Quantum dots-loaded self-healing gels for versatile fluorescent assembly. *Nanomaterials (Basel)* 2022;12(3):452. DOI: 10.3390/nano12030452
26. Pisanic T.R. 2nd, Zhang Y., Wang T.H. Quantum dots in diagnostics and detection: principles and paradigms. *Analyst* 2014;139(12):2968–81. DOI: 10.1039/c4an00294f
27. Linkov P.A., Vokhmintcev K.V., Samokhvalov P.S., Nabiev I.R. Ultrasmall quantum dots for fluorescent bioimaging *in vivo* and *in vitro*. *Opt Spectrosc* 2017;122(1):8–11. DOI: 10.1134/S0030400X17010143
28. Kandi D., Mansingh S., Behera A., Parida K. Calculation of relative fluorescence quantum yield and Urbach energy of colloidal CdS QDs in various easily accessible solvents. *J Lumin* 2021;231:117792. DOI: 10.1016/j.jlumin.2020.117792
29. Neo D.C.J., Goh W.P., Lau H.H., Shanmugam J. CuInS₂ quantum dots with thick ZnSexS_{1-x} shells for a luminescent solar concentrator. *ACS Appl Nano Mater* 2020;3:6489–96. DOI: 10.1021/acsanm.0c00958
30. Dey S.C., Nath S.S. Size-dependent fluorescence in CdSe quantum dots. *Emer Mat Res* 2012;1(3):117–20. DOI: 10.1680/emr.11.00004
31. Montón H., Nogués C., Rossinyol E. et al. QDs *versus* Alexa: reality of promising tools for immunocytochemistry. *J Nano-biotechnology* 2009;7:4. DOI: 10.1186/1477-3155-7-4
32. Benson K., Ghimire A., Pattammattel A., Kumar C.V. Protein biophosphors: Biodegradable, multifunctional, protein-based hydrogel for white emission, sensing, and pH detection. *Adv Funct Mater* 2017;27:1702955. DOI: 10.1002/adfm.201702955
33. Li C.Y., Zheng S.Y., Du C. et al. Carbon dot/poly(methylacrylic acid) nanocomposite hydrogels with high toughness and strong fluorescence. *ACS Appl Polym Mater* 2020;2:1043–52. DOI: 10.1021/acsapm.9b00971
34. Xu J., Zhang Y., Zhu W. et al. Synthesis of Polymeric nanocomposite hydrogels containing the pendant ZnS nanoparticles: Approach to higher refractive index optical polymeric nanocomposites. *Macromol* 2018;51(Is. 7):2672–81. DOI: 10.1021/acs.macromol.7b02315
35. Yang T., Li Q., Wen W. et al. Cadmium sulfide quantum dots/poly(acrylic acid-co-acrylic amide) composite hydrogel synthesized by gamma irradiation. *Rad Phys Chem* 2018;145:130–4. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2017.10.012
36. Zhang H., Wang X., Liao Q. et al. Embedding perovskite nanocrystals into a polymer matrix for tunable luminescence probes in cell imaging. *Advan Func Mat* 2017;27(7):1604382. DOI: 10.1002/adfm.201604382
37. Gaponik N., Wolf A., Marx R. et al. Three-dimensional self-assembly of thiol-capped CdTe nanocrystals: Gels and aerogels as building blocks for nanotechnology. *Advan Mat* 2008;20(Is.22):4257–62. DOI: 10.1002/adma.200702986
38. Hörner M., Becker J., Bohnert R. et al. A photoreceptor-based hydrogel with red light-responsive reversible sol-gel transition as transient cellular matrix. *Adv Mat Tech n/a*:2300195. DOI: 10.1002/admt.202300195
39. Bhattacharya S., Nandi S., Jelinek R. Carbon-dot–hydrogel for enzyme-mediated bacterial detection. *RSC Advances* 2017;7:588–94. DOI: 10.1039/C6RA25148J
40. Lee T., Teng T.Z.J., Shelat V.G. Carbohydrate antigen 19-9 – tumor marker: Past, present, and future. *World J Gastrointest Surg* 2020;12(12):468–90. DOI: 10.4240/wjgs.v12.i12.468
41. Piloto A.M.L., Ribeiro D.S.M., Rodrigues S.S.M. et al. Cellulose-based hydrogel on quantum dots with molecularly imprinted polymers for the detection of CA19-9 protein cancer biomarker. *Mikrochim Acta* 2022;189(4):134. DOI: 10.1007/s00604-022-05230-8
42. Ahmadi-Sangachin E., Mohammadnejad J., Hosseini M. Fluorescence Self-assembled DNA hydrogel for the determination of prostate specific antigen by aggregation induced emission. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2023;303:123234. DOI: 10.2139/ssrn.4313053
43. Bautista-Sánchez D., Arriaga-Canon C., Pedroza-Torres A. et al. The promising role of miR-21 as a cancer biomarker and its importance in RNA-based therapeutics. *Mol Ther Nucleic Acids* 2020;20:409–20. DOI: 10.1016/j.omtn.2020.03.003
44. Mohammadi S., Mohammadi S., Salimi A. A 3D hydrogel based on chitosan and carbon dots for sensitive fluorescence detection

- of microRNA-21 in breast cancer cells. *Talanta* 2021;224:121895. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121895
45. Gao Y., Feng B., Han S. et al. The roles of microRNA-141 in human cancers: From diagnosis to treatment. *Cell Physiol Biochem* 2016;38(2):427–48. DOI: 10.1159/000438641
46. Li C., Li H., Ge J., Jie G. Versatile fluorescence detection of microRNA based on novel DNA hydrogel-amplified signal probes coupled with DNA walker amplification. *Chem Commun (Camb)* 2019;55(27):3919–22. DOI: 10.1039/C9CC00565J
47. Gong X., Zhou W., Chai Y. et al. MicroRNA-induced cascaded and catalytic self-assembly of DNA nanostructures for enzyme-free and sensitive fluorescence detection of microRNA from tumor cells. *Chem Commun (Camb)* 2016;52(12):2501–4. DOI: 10.1039/C5CC08861E
48. Zhang G., Zhou S., Yan G. et al. Quantum dot-crosslinked light-guiding hydrogels for sensing folate receptor-overexpressed cancer cells. *Sens Actuators B Chem* 2021;349:130815. DOI: 10.1016/j.snb.2021.130815
49. Bolli A., Galluzzo P., Ascenzi P. et al. Laccase treatment impairs bisphenol A-induced cancer cell proliferation affecting estrogen receptor alpha-dependent rapid signals. *IUBMB life* 2008;60(12):843–52. DOI: 10.1002/iub.130
50. Ruiz-Palmero C., Benítez-Martínez S., Soriano M.L., Valcárcel M. Fluorescent nanocellulosic hydrogels based on graphene quantum dots for sensing laccase. *Anal Chim Acta* 2017;974:93–9. DOI: 10.1016/j.aca.2017.04.018
51. Tse R.T.-H., Wong C.Y.-P., Chiu P.K.-F., Ng C.F. The potential role of spermine and its acetylated derivative in human malignancies. *Int J Mol Sci* 2022;23(3):1258. DOI: 10.3390/ijms23031258
52. Nair R.R., Debnath S., Das S. et al. A highly selective turn-on biosensor for measuring spermine/spermidine in human urine and blood. *ACS Appl Bio Mater* 2019;2(6):2374–87. DOI: 10.1021/acsabm.9b00084
53. Traverso N., Ricciarelli R., Nitti M. et al. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:972913. DOI: 10.1155/2013/972913
54. Wu R., Ge H., Liu C. et al. A novel thermometer-type hydrogel sensor for glutathione detection. *Talanta* 2019;196:191–6. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.12.020
55. Grant C.E., Flis A.L., Ryan B.M. Understanding the role of dopamine in cancer: Past, present and future. *Carcinogenesis* 2022;43(6):517–27. DOI: 10.1093/carcin/bgac045
56. Yuan J., Wen D., Gaponik N., Eychmüller A. Enzyme-encapsulating quantum dot hydrogels and xerogels as biosensors: Multifunctional platforms for both biocatalysis and fluorescent probing. *Angew Chem Int Ed Engl* 2013;52(3):976–9. DOI: 10.1002/anie.201205791
57. Fini M.A., Elias A., Johnson R.J., Wright R.M. Contribution of uric acid to cancer risk, recurrence, and mortality. *Clin Transl Med* 2012;1(1):16. DOI: 10.1186/2001-1326-1-16
58. Azmi N.E., Rashid A.H.A., Abdullah J. et al. Fluorescence biosensor based on encapsulated quantum dots/enzymes/sol-gel for non-invasive detection of uric acid. *J Luminescence* 2018;202:309–15. DOI: 10.1016/j.jlumin.2018.05.075
59. Wang M., Zhu J., Lubman D.M., Gao C. Aberrant glycosylation and cancer biomarker discovery: a promising and thorny journey. *Clin Chem Lab Med* 2019;57(4):407–16. DOI: 10.1515/cclm-2018-0379
60. Koshi Y., Nakata E., Yamane H., Hamachi I. A fluorescent lectin array using supramolecular hydrogel for simple detection and pattern profiling for various glycoconjugates. *J Am Chem Soc* 2006;128(32):10413–22. DOI: 10.1021/ja0613963

Вклад авторов

П.М. Соколов: сбор, анализ данных литературы, подготовка текста;
П.С. Самохвалов, Д.А. Баранова: анализ данных литературы;
А.В. Суханова: анализ данных литературы, экспертный анализ текста.

Author's contributions

P.M. Sokolov: collection and analysis of literature data, text preparation;
P.S. Samokhvalov, D.A. Baranova: analysis of literature data;
A.V. Sukhanova: analysis of literature data, validation of the text.

ORCID авторов / ORCID of authors

П.М. Соколов / P.M. Sokolov: <https://orcid.org/0000-0001-5321-3753>
П.С. Самохвалов / P.S. Samokhvalov: <https://orcid.org/0000-0002-2878-8376>
Д.А. Баранова / D.A. Baranova: <https://orcid.org/0009-0008-6381-5107>
А.В. Суханова / A.V. Sukhanova: <https://orcid.org/0000-0003-2796-7898>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Данная работа была поддержана грантом № 075-15-2021-935 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Financing. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation through the grant № 075-15-2021-935.

Статья поступила: 04.08.2023. Принята в печать: 04.10.2023.

Article received: 04.08.2023. Accepted for publication: 04.10.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-28-34>

Диагностика миелодиспластических синдромов после цитотоксической терапии острого миелоидного лейкоза в эру молекулярных исследований, трудности стратификации риска и выбора терапии: первое отечественное описание клинического случая и обзор литературы

А.Д. Ширин¹, А.С. Антипова¹, О.Ю. Баранова^{1,2}, А.М. Ибрагимов¹

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, 1А

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

Диагностика вторичных миелоидных неоплазий (миелоидных неоплазий, связанных с предшествующей терапией), ассоциированных с лечением солидных опухолей, в большинстве случаев не связана с существенными трудностями. Проблему составляет диагностика вторичных миелодиспластических синдромов после лечения острых миелоидных лейкозов. Сложность ранней диагностики вторичных миелодиспластических синдромов обусловлена разграничением этой нозологии и раннего рецидива предшествующего острого миелоидного лейкоза и, как следствие, трудностями прогноза и стратификации риска для выбора лечения. Актуальность этой проблемы объясняется редкими описаниями подобных наблюдений. Диагностика вторичного миелодиспластического синдрома, по нашему мнению, может быть основана на отсутствии клональной связи опухолевого клона при молекулярном исследовании с 1-м (предшествующим) заболеванием. В настоящей публикации мы приводим первое отечественное описание клинического случая миелодиспластического синдрома, диагностированного после химиотерапии острого миелоидного лейкоза, основываясь на различиях в цитоморфологии, иммунофенотипировании и молекулярном исследовании. Мы трактовали прогноз как благоприятный и назначили соответствующее лечение.

Ключевые слова: миелоидные неоплазии, вторичный миелодиспластический синдром, острый миелоидный лейкоз, молекулярное исследование, прогноз

Для цитирования: Ширин А.Д., Антипова А.С., Баранова О.Ю., Ибрагимов А.М. Диагностика миелодиспластических синдромов после цитотоксической терапии острого миелоидного лейкоза в эру молекулярных исследований, трудности стратификации риска и выбора терапии: первое отечественное описание клинического случая и обзор литературы. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(4):28–34. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-28-34>

Diagnosis of myelodysplastic syndromes after cytotoxic therapy for acute myeloid leukemia in the era of molecular research, difficulties in risk stratification and choice of therapy: The first domestic case report and literature review

Anton D. Shirin¹, Alina S. Antipova¹, Olga Yu. Baranova^{1,2}, Aidemir M. Ibragimov¹

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

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

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

Diagnosis of secondary myeloid neoplasms (therapy-related myeloid neoplasms) associated with therapy of solid tumors, in most cases, is not associated with significant difficulties. The problem is the diagnosis of secondary myelodysplastic syndromes after the treatment of acute myeloid leukaemias. The complexity of early diagnosis of secondary myelodysplastic syndromes is due to the differentiation of this nosology and the early recurrence of previous acute myeloid leukemia and, as a result, the difficulties of prognosis and risk stratification for therapeutic management. The relevance of this problem is explained by the rare case reports. Making the diagnosis of secondary myelodysplastic syndrome, in our opinion, can be based on the absence of a connection of cancer cell clone with the first (previous) disease in a molecular study. In this publication, we describe the first domestic case report of myelodysplastic syndrome diagnosed after chemotherapy for acute myeloid leukemia, based on differences in cytomorphology, immunophenotyping and molecular research. We interpreted the prognosis as favorable and prescribed appropriate treatment.

Keywords: myeloid neoplasia, secondary myelodysplastic syndrome, acute myeloid leukemia, molecular study, prognosis

For citation: Shirin A.D., Antipova A.S., Baranova O.Yu., Ibragimov A.M. Diagnosis of myelodysplastic syndromes after cytotoxic therapy for acute myeloid leukemia in the era of molecular research, difficulties in risk stratification and choice of therapy: The first domestic case report and literature review *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(4):28–34. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-28-34>

Введение

Диагностика миелодиспластических синдромов (МДС), связанных с предшествующей противоопухолевой терапией солидных опухолей, в большинстве случаев не связана с существенными трудностями. Проблему составляет диагностика вторичных МДС (ВМДС), связанных с предшествующей терапией, после лечения острых миелоидных лейкозов (ОМЛ). Сложность ранней диагностики ВМДС обусловлена разграничением этой нозологии и рецидива ОМЛ и, как следствие, — отнесением больного к той или иной группе риска (стратификация риска) для выбора лечения.

Имеются описания ВМДС и вторичных ОМЛ (ВОМЛ) после предшествующего острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) [1–3], вторичного ОЛЛ (ВОЛЛ) [4, 5], включая наблюдения ВОЛЛ после предшествующего лечения ОЛЛ и МДС [6, 7].

Описания вторичных миелоидных неоплазий (ВМН) после лечения ОМЛ практически не встречаются. В исследовании D. Martínez-Cuadrón [8] в группе с ВОМЛ включены пациенты:

- 1) с ОМЛ, возникшими из МДС;
- 2) ОМЛ, возникшими из миелодиспластических/миелолипролиферативных неоплазий (МД/МПН);
- 3) ОМЛ, возникшими из МПН;
- 4) ОМЛ, возникшими после неоплазий без предшествующей химиотерапии/лучевой терапии;
- 5) ОМЛ, связанными с предшествующей терапией.

Некоторые исследователи включают в когорту пациентов с ВОМЛ больных с предшествующей апластической анемией и аутоиммунными заболеваниями (например, ревматоидным артритом, псориазом и пр.).

Прежде были опубликованы предложения по разграничению раннего рецидива ОЛЛ и ВОЛЛ. Так, J. Zuna и соавт. предлагают использовать следующие критерии: А — отсутствие связи между клономальностью первичного ОЛЛ и ВОЛЛ; В — существенные изменения иммунофенотипа, существенные изменения кариотипа, появление или исчезновение слитного гена. По мнению исследователей, диагноз ВОЛЛ можно установить при наличии критерия А и по крайней мере 1 критерия В. Помимо этого, на ВОЛЛ указывает длительный срок между 1-м и 2-м заболеванием [6].

Однако в эру молекулярных исследований признак «существенные изменения кариотипа» может утрачивать значение. Диагноз ВОЛЛ следует ставить при отсутствии клономальной связи с первым (предшествующим) заболеванием [9]. Возможно, эти принципы диагностики (диагностические признаки), в первую очередь генетические и молекулярно-генетические, могут быть применены и к ВМДС/ВОМЛ, поскольку они лежат в основе фенотипических характеристик опухоли, т. е. в основе фенотипических различий 1-го и 2-го заболеваний. С нашей точки зрения, особый акцент следует сделать на молекулярном исследовании (для выявления разных клонов опухолевых клеток) в случаях нормального кариотипа, как первичных МН, так и ВМДС. Кроме того, нужно принимать во внимание возможность формирования резистентности опухолевых клеток, которая развивается после использования химиопрепаратов (причем следует помнить о том, что «после» не означает «вследствие»).

В настоящей публикации приводим описание собственного клинического случая МДС, диагностированного после химиотерапии ОМЛ, основываясь

на различиях в цитоморфологии, иммунофенотипировании и молекулярном исследовании. В этом наблюдении мы трактовали прогноз как благоприятный и назначили соответствующее лечение.

Клиническое наблюдение

Больной А., 40 лет, находится под диспансерным наблюдением по поводу ОМЛ, с мутацией СЕВРА, М1 — по франко-американско-британской (ФАБ) классификации ОМЛ. Состояние после 2 курсов индукции ремиссии «3 + 7» с августа по октябрь 2016 г. Клинико-гематологическая и молекулярная ремиссии. Состояние после 4 курсов HiDas с ноября 2016 г. по май 2017 г. — негативная ремиссия минимальной остаточной болезни. Диагностика и лечение проводились в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

В феврале 2022 г. выявлена анемия. Общий клинический анализ крови от 21.03.2022: анемия (гемоглобин — 68 г/л, эритроциты — $1,66 \times 10^{12}/л$), макроцитарная, гиперхромная. Число лейкоцитов, нейтрофилов и тромбоцитов находилось в пределах нормальных значений. Проводились гемотрансфузии эритроцитов не чаще 1 раза в 2 мес. При ультразвуковом исследовании: увеличение размеров печени и селезенки, диффузные изменения паренхимы печени и поджелудочной железы, хронический холецистит, хронический панкреатит.

При очередном обращении (март 2022 г.): клинические признаки анемии, другой патологии не выявлено. При эзофагогастродуоденоскопии (март 2022 г.) обнаружены очаговый антральный гастрит, множественные эпителиальные образования луковицы 12-перстной кишки. Важные диагностические параметры: общий клинический анализ крови от 25.02.2022: анемия (гемоглобин 83 г/л), макроцитарная, гиперхромная. Число лейкоцитов, нейтрофилов и тромбоцитов — в пределах нормальных значений.

Эндогенный эритропоэтин от 21.03.2022: 1250,00 мМЕ/мл (норма 2,59–18,50), ферритин от 21.04.2022: 528 мкг/л (норма 20–250) и трансферрин — 1,81 г/л (норма 2,15–3,66).

Аспират костного мозга (КМ) от 23.03.2022: нормоклеточный КМ, в гранулоцитарном ряду снижено число сегментоядерных нейтрофилов. Определяется выраженная дисплазия гранулоцитов. Эритроидный росток расширен. Дисплазия эритрокариоцитов. Число сидеробластов увеличено до 77 %, из них 63 % — кольцевые формы. Дисплазия мегакариоцитов: клетки с разъединенными ядрами, одноядерные формы. Число бластных клеток в КМ — 0,6 %.

Иммуногистохимическое исследование материала трепанобиопсии КМ от 24.03.2022: гиперклеточная гемопоэтическая ткань. Морфологические признаки выраженной гиперплазии эритроидного ростка со сдвигом созревания влево и признаками дисплазии. Бластные

формы экспрессируют CD71, гликофорин. Дисплазия клеток гранулоцитарного ростка не определяется, при реакции на антитела к миелопероксидазе определяются многочисленные бластные клетки. Количество мегакариоцитов повышено, клетки с признаками полиморфизма, встречаются гипобулярные формы. При реакции с анти-CD117, CD34 определяются позитивные бластные клетки. При реакции с анти-CD14 видны немногочисленные дискретно расположенные моноциты.

Цитогенетическое исследование клеток КМ методом G-дифференциального окрашивания (анализ 20 метафаз) от 28.03.2022: кариотип: 46, XY, нарушений не обнаружено.

Молекулярно-цитогенетическое исследование методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) 28.03.2022: *nuc ish (GATA2x2)*, (MECOMx2) [100], *nuc ish (5q31x2)*, (5q33x2) [100], *nuc ish (7q22x2)*, (7q36x2) [100], *nuc ish (XCE8x2)* [100], *nuc ish (20q12x2)* (20q11x2) [100], *nuc ish (TP53x2)* (SE17x2) [100]. В результате молекулярно-цитогенетического исследования нарушений не обнаружено.

Молекулярно-генетическое исследование клеток КМ: определение мутаций в полной последовательности гена СЕВРА методом прямого секвенирования продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) по Сэнгеру от 28.03.2022: мутации гена СЕВРА, которые определялись ранее, не обнаружены.

В связи с выявлением кольцевых сидеробластов в аспирате КМ проводилось исследование мутаций гена SF3B1. Определение частых мутаций в гене SF3B1 методом прямого секвенирования ПЦР-продуктов по Сэнгеру (анализ 14 и 15 экзонов) от 28.03.2022: в гене SF3B1 обнаружена патогенная мутация SF3B1:c.2098A>G (p.Lys700Glu).

Таким образом, в марте 2022 г. у больного выявлены:

- клональное кроветворение миелоидной направленности, которое отсутствовало ранее (новая мутация — мутация гена SF3B1, сопряженная с МДС с кольцевыми сидеробластами и мультилинейной дисплазией (МДС-КС-МЛД), при отсутствии ранее определявшейся мутации гена СЕВРА);
- дисплазия клеток эритроидного ростка (кровь и КМ), дисплазия клеток мегакариоцитарного ростка (КМ), дисплазия гранулоцитов (КМ);
- гиперплазия КМ;
- нарушение гистоархитектоники КМ;
- нарушение обмена железа;
- повышение уровня эндогенного эритропоэтина.

Установлен диагноз: МДС с кольцевыми сидеробластами и мультилинейной дисплазией (МДС-КС-МЛД) с мутацией SF3B1, связанный с предшествующим лечением ОМЛ ингибиторами топоизомеразы II (антрациклинами) 2 курса по схеме «3 + 7» (2016 г.) ОМЛ с мутацией СЕВРА (вариант М1 по ФАБ-классификации). Хронический панкреатит и холецистит вне обострения, очаговый

антральный гастрит. Множественные полипы луковицы 12-перстной кишки.

Предпринята попытка отнесения больного в группу риска по шкалам IPSS (International Prognostic Scoring System – Международная числовая система оценки прогноза), WPSS (WHO classification-based Prognostic Scoring System – Числовая система оценки прогноза, основанная на классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), IPSS-R (Revised International Prognostic Scoring System – Пересмотренная международная числовая система оценки прогноза), MDAPSS (MD Anderson Prognostic Scoring System – Числовая система оценки прогноза MD Anderson). Согласно суммарному числу баллов пациент отнесен к группе принципиально благоприятного прогноза, несмотря на вторичный характер МДС.

Назначено: молекулярно-цитогенетическое исследование (FISH для исключения аномалий хромосом 5 и 7), терапия для группы благоприятного прогноза (луспATERцепт, поскольку не ожидался эффект от эритропоэтинов), трансфузионная терапия по показаниям, контроль показателей обмена железа.

Через 6 мес после постановки диагноза ВМДС и через 2 мес лечения луспATERцептом (в сентябре 2022 г.) состояние больного принципиально не изменилось, кариотип 46,XY (20 метафаз), аномалии хромосом 5 и 7 не выявлено, транслокация с вовлечением гена EVI1 локуса 3q26 не обнаружена, уровень гемоглобина снизился до 59 г/л, эритроциты – $1,52 \times 10^{12}/л$, эндогенный эритропоэтин – 6400,00 мМ/мл, ферритин – менее 1000 нг/мл (увеличение выраженности цитопении, т. е. неудача лечения по критериям International Working Group 2006 г. при терапии луспATERцептом).

Принято решение прекратить терапию луспATERцептом, после контрольного морфологического исследования клеток КМ с цитогенетическим исследованием (для исключения прогрессирования) начать лечение следующего этапа. В другом лечебном учреждении назначены леналидомид 10 мг/кг с 1-го по 21-й день каждого месяца и деферазирокс по 14 мг/кг/сут (хотя общее число гемотрансфузий эритроцитов составило менее 20, уровень трансферрина не превышал 1000 нг/мл и нарушений биохимических показателей функции печени, поджелудочной железы не отмечено). Учитывая вторичный характер МДС, нами рекомендовано в перспективе рассматривать больного в качестве кандидата на аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (осуществить поиск донора), продолжить трансфузионную терапию по показаниям, контролировать показатели обмена железа.

Обсуждение

Большинство прогностических инструментов для МДС разработаны для пациентов с МДС *de novo*

[10–12]. Исключением является MDAPSS [13]. Авторы MDAPSS проанализировали данные 1915 пациентов с МДС, включая больных хроническим миеломоноцитарным лейкозом с лейкоцитозом, ВМДС и МДС с предшествующей терапией. Только у 507 (26 %) пациентов был МДС *de novo* без предшествующей терапии, для которого может использоваться шкала IPSS. Критерии для включения в анализ были следующими: 1) возраст ≥ 16 лет; 2) подтвержденный диагноз МДС с < 30 % бластных клеток. Многофакторный анализ неблагоприятных прогностических признаков в исследуемой группе выявил такие неблагоприятные независимые факторы, как неудовлетворительное общее состояние по шкале ECOG (The Eastern Cooperative Oncology Group/World Health Organization Performance Status Scale – Восточной кооперативной группы исследования рака), пожилой возраст, тромбоцитопения, анемия, увеличение количества бластных клеток КМ, лейкоцитоз (который встречается при хроническом миеломоноцитарном лейкозе), аномалии хромосомы 7 или сложные (≥ 3) хромосомные аномалии, а также предшествующие гемотрансфузии эритроцитов и/или тромбоцитов. Новая прогностическая модель МДС позволила разделить пациентов на 4 группы (табл. 1, 2). Таким образом, исследователи предложили новую числовую модель оценки риска для пациентов с МДС и хроническим миеломоноцитарным лейкозом, которая повышает прогностическую ценность IPSS и применима ко всем пациентам, а не только с ПМДС, которые ранее не получали лечение.

Все эти данные диктуют необходимость подразделения пациентов с ВМДС на различные категории и группы риска [14].

Помимо аномалий хромосом 5 и 7, а также сложного кариотипа, неблагоприятным прогностическим значением обладает мутация гена TP53 [15]. В классификации ВОЗ 2022 г. [16] указывается на целесообразность замены термина «миелодиспластические синдромы» на термин «миелодиспластические неоплазии», а также возможность выделения отдельного варианта заболевания – МДС с малым числом бластных клеток и мутацией SF3B1 (MDS-SF3B1). Для последнего характерно отсутствие делеции 5q, моносомии 7 или сложного кариотипа. Предлагается введение термина «миелоидные неоплазии (МДС, МД/МПН, ОМЛ) после цитотоксической терапии (МН-пЦТ, МН-рСТ)». К факторам, индуцирующим МН, отнесены ингибиторы PARP1 (poly-(ADP-ribose)polymerase – поли[АДФ-рибоза]-полимераза).

В классификации ВОЗ 2017 г. ВМДС объединены и классифицируются вместе как со связанными с предшествующей терапией ОМЛ, так и со связанными с предшествующей терапией МД/МПН в общую группу независимо от морфологических или

Таблица 1. Оценка параметров МДС (0–15 баллов) [13]

Table 1. Myelodysplastic syndrome risk score (0–15 points) [13]

Прогностический фактор Prognostic factor	Баллы Points
Общее состояние ≥ 2 Performance status ≥ 2	2
Возраст, лет Age, years	
60–64	1
≥ 65	2
Число тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$ Platelets, $\times 10^9/\text{L}$	
< 30	3
30–49	2
50–199	1
Гемоглобин < 120 г/л Hemoglobin < 120 g/L	2
Число бластных клеток в костном мозге, % Bone marrow blasts, %	
5–10	1
11–29	2
Число лейкоцитов $> 20 \times 10^9/\text{л}$ White blood cells $> 20 \times 10^9/\text{L}$	2
Кариотип: аномалии хромосомы 7 или сложные (≥ 3) аномалии Karyotype: chromosome 7 abnormality or complex (≥ 3) abnormalities	3
Наличие предшествующих гемотрансфузий Prior transfusion, yes	1

прогностических особенностей. При анализе данных 2087 пациентов с ВМДС (кроме ряда случаев, включающих ВМДС из ОМЛ) из разных международных групп МДС обнаружено, что применение классификации ВОЗ 2017 г. для МДС *de novo* статистически значимо предсказывает время до трансформации и выживаемость. Результаты, касающиеся тщательно проанализированных цитогенетических данных, классификаций и прогностических оценок, подтвердили то, что ВМДС так же гетерогенны, как и МДС *de novo* и заслуживают такой же тщательной дифференциации в отношении риска [14].

Согласно этому исследованию в группе ВМДС чаще встречались пациенты с высоким (22 %) и очень высоким (31 %) риском по шкале IPSS-R. В то время как в группе МДС *de novo* их доля составила 14 и 12 % соответственно. Все классификации и прогностические системы были способны выделить группы риска в этой когорте ВМДС, хотя эффективность прогностических систем была ниже, чем в группе МДС *de novo*. Этот анализ данных показал оправданность отдельной классификации и прогностической оценки ВМДС.

Описания ВМДС и ВОМЛ после предшествующего ОМЛ встречаются редко. Так, при анализе мутаций в группе больных ВМДС/ВОМЛ ($n = 38$) в исследование включен только 1 пациент с предшествующим ОМЛ [17]. В анализ ВМН пациенты с «рецидивом» МДС (ВМДС) после лечения ОМЛ или хронического миелопролиферативного заболевания обычно не включаются [18]. Из другого, более раннего, анализа исключены пациенты, у которых был «второй» ОМЛ, связанный с терапией «первого» ОМЛ (после ОМЛ в качестве первого заболевания), если кариотип исходного ОМЛ не отличался от ВОМЛ [19].

Таблица 2. Оценка ожидаемой общей выживаемости по суммарному числу баллов в группах риска [13]

Table 2. Estimated overall survival by prognostic scores [13]

Группа риска и баллы Risk group and points	Общая выживаемость Survival			
	Число пациентов, абс. (%) Number of patients, abs. (%)	Медиана, мес Median, months	Доля больных к 3 годам, % Share of patients by 3 years, %	Доля больных к 6 годам, % Share of patients by 6 years, %
Группа низкого риска Low-risk group				
0–4	157 (16)	54	63	38
Группа промежуточного риска 1 Intermediate-1 risk group				
5	111 (12)	30	40	14
6	116 (12)	23	29	14

Окончание табл. 2

End of table 2

Группа риска и баллы Risk group and points	Общая выживаемость Survival			
	Число пациентов, абс. (%) Number of patients, abs. (%)	Медиана, мес Median, months	Доля больных к 3 годам, % Share of patients by 3 years, %	Доля больных к 6 годам, % Share of patients by 6 years, %
Группа промежуточного риска 2 Intermediate-2 risk group				
7	127 (13)	14	19	8
8	106 (11)	13	13	4
Группа высокого риска High-risk group				
9	97 (10)	10	10	2
≥10	244 (25)	5	2	0

Заключение

Наличие как таковой ВМН не должно обуславливать заведомое отнесение пациента к группе неблагоприятного прогноза. Тактика выбора лечения должна основываться на прогностических признаках (особенно цитогенетических/молекулярно-генетических) ко времени постановки диагноза. Однако следует иметь в виду то, что предшествующее лечение может формировать рефрактерность к предлагаемой терапии, в рассматриваемом

случае — лечение цитарабином и антрациклинами (ингибиторами топоизомеразы II), а также помнить о том, что «вторичность» все же может иметь неблагоприятное значение. По этой причине больных с ВМДС (даже из группы благоприятного прогноза) следует рассматривать в качестве потенциальных кандидатов на аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток. Не исключена необходимость создания числовой прогностической модели для ВМДС.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Schmiegelow K., Levinsen M.F., Attarbaschi A. et al. Second malignant neoplasms after treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2013;31(19):2469–76. DOI: 10.1200/JCO.2012.47.0500. PMID: 23690411
- Pui C.H., Ribeiro R.C., Hancock M.L. et al. Acute myeloid leukemia in children treated with epipodophyllotoxins for acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1991;325(24):1682–7. DOI: 10.1056/NEJM199112123252402
- Махачева Ф.А., Валиев Т.Т. Особенности вторичного острого миелоидного лейкоза у детей. *Онкогематология* 2020;15(4):12–7. DOI: 10.17650/1818-8346-2020-15-4-12-17 Makhacheva F.A., Valiev T.T. Clinical features of secondary acute myeloid leukemia in children. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2020;15(4):12–7 (In Russ.) DOI: 10.17650/1818-8346-2020-15-4-12-17
- Khan S.R., Tariq M., Fayyaz S.M. et al. Lenalidomide induced secondary acute lymphoblastic leukemia in a multiple myeloma patient: A case-report. *Leuk Res Rep* 2022;17:100315. DOI: 10.1016/j.lrr.2022.100315
- Shivakumar R., Tan W., Wilding G.E. et al. Biologic features and treatment outcome of secondary acute lymphoblastic leukemia – A review of 101 cases. *Ann Oncol* 2008;19(9):1634–8. DOI: 10.1093/annonc/mdn182
- Zuna J., Cavé H., Eckert C. et al. Childhood secondary ALL after ALL treatment. *Leukemia* 2007;21(7):1431–5. DOI: 10.1038/sj.leu.2404718
- Xie W., Chen Z., Wang S.A. et al. Lymphoblastic leukemia following myelodysplastic syndromes or myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Leuk Lymphoma* 2019;60(12):2993–3001. DOI: 10.1080/10428194.2019.1605509
- Martínez-Cuadrón D., Megías-Vericat J.E., Serrano J. et al. Treatment patterns and outcomes of 2310 patients with secondary acute myeloid leukemia: A PETHEMA registry study. *Blood Adv* 2022;6(4):1278–95. DOI: 10.1182/bloodadvances.2021005335
- Szczepanski T., Willemsse M.J., Kamps W.A. et al. Molecular discrimination between relapsed and secondary acute lymphoblastic leukemia: proposal for an easy strategy. *Med Pediatr Oncol* 2001;36(3):352–8. DOI: 10.1002/mpo.1085
- Greenberg P., Cox C., LeBeau M.M. et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89(6):2079–88. DOI: 10.1182/blood.V89.6.2079
- Greenberg P.L., Tuechler H., Schanz J. et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012;120(12):2454–65. DOI: 10.1182/blood-2012-03-420489

12. Malcovati L., Germing U., Kuendgen A. et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2007;25(23):3503–10. DOI: 10.1200/JCO.2006.08.5696
13. Kantarjian H., O'Brien S., Ravandi F. et al. Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original International Prognostic Scoring System. *Cancer* 2008;113(6):1351–61. DOI: 10.1002/encr.23697
14. Kuendgen A., Nomdedeu M., Tuechler H. et al. Therapy-related myelodysplastic syndromes deserve specific diagnostic sub-classification and risk-stratification – an approach to classification of patients with t-MDS. *Leukemia* 2021;35(3):835–49. DOI: 10.1038/s41375-020-0917-7
15. Sangiorgio V., Calaminici M. Therapy related myeloid neoplasm (therapy related AML). *PathologyOutlines.com* website. Available at: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/bonemarrowneoplastictherapy.html>. Accessed: 25.10.2022.
16. Khoury J.D., Solary E., Abla O. et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of haematolymphoid tumours: Myeloid and histiocytic dendritic neoplasms. *Leukemia* 2022;36(7):1703–19. DOI: 10.1038/s41375-022-01613-1
17. Shih A.H., Chung S.S., Dolezal E.K. et al. Mutational analysis of therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myelogenous leukemia. *Haematologica* 2013(7);98(6):908–12. DOI: 10.3324/haematol.2012.076729
18. Churpek J.E., Larson R.A. The evolving challenge of therapy-related myeloid neoplasms. *Best Pract Res Clin Haematol* 2013;26(4):309–17. DOI: 10.1016/j.beha.2013.09.001
19. Rowley J.D., Olney H.J. International workshop on the relationship of prior therapy to balanced chromosome aberrations in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: Overview report. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;33(4):331–45. DOI: 10.1002/gcc.10040

Вклад авторов

А.Д. Ширин: получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи, окончательное одобрение рукописи;

А.С. Антипова: получение данных для анализа, окончательное одобрение рукописи;

О.Ю. Баранова: обзор публикаций по теме статьи, окончательное одобрение рукописи;

А.М. Ибрагимов: написание текста рукописи, окончательное одобрение рукописи.

Author's contributions

A.D. Shirin: obtaining data for analysis, review of publications on the topic of the article, writing the text of the manuscript, final approval of the manuscript;

A.S. Antipova: obtaining data for analysis, final approval of the manuscript;

O.Yu. Baranova: review of publications on the topic of the article, final approval of the manuscript;

A.M. Ibragimov: writing the text of the manuscript, final approval of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

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

А.С. Антипова / A.S. Antipova: <https://orcid.org/0000-0002-1731-8336>

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

А.М. Ибрагимов / A.M. Ibragimov: <https://orcid.org/0000-0002-1229-6166>

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Пациент подписал информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The patient signed the informed consent to participate in the study.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 02.11.2022. Принята в печать: 22.09.2023.

Article received: 02.11.2022. Accepted for publication: 22.09.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-35-42>

Анализ уровня мРНК ИЛ-10 в периферической крови больных раком и доброкачественной гиперплазией предстательной железы

О.А. Коровин^{1,2}, А.В. Алясова², Х.М. Ариуа³, Д.В. Новиков⁴, Н.В. Красногорова^{1,3}, В.В. Новиков^{3,4}

¹ГБУЗ НО «Городская больница №33»; Россия, 603032 Нижний Новгород, пр-кт Ленина, 54;

²ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет»; Россия, 603005 Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

³ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»; Россия, 603022 Нижний Новгород, пр-кт Гагарина, 23;

⁴ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора; Россия, 603950 Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71

Контакты: Олег Александрович Коровин dok.kor1177@mail.ru

Введение. Интерлейкин 10 (ИЛ-10) является плейотропным цитокином, обладает иммуномодулирующими свойствами и может ингибировать развитие и прогрессирование опухоли или стимулировать ее рост.

Цель исследования – анализ изменений уровня мРНК ИЛ-10 в периферической крови (ПК) больных раком (РПЖ) и доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) в сопоставлении с клинико-лабораторными данными.

Материалы и методы. Под наблюдением находились 63 больных с гистологически подтвержденным РПЖ и 52 больных с гистологически подтвержденной ДГПЖ. Контрольную группу составили 30 практически здоровых лиц, сопоставимых по возрасту. Определение относительного уровня мРНК ИЛ-10 в образцах ПК проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с обратной транскрипцией.

Результаты. Как у больных РПЖ, так и у больных ДГПЖ в ПК наблюдалось статистически значимое снижение уровня мРНК ИЛ-10 по сравнению с группой контроля. При РПЖ самые низкие уровни выявлены у пациентов с концентрацией простатспецифического антигена выше 10 нг/л и при объеме простаты более 50 см³. Различия в уровне мРНК ИЛ-10 на Т2- и Т3-стадиях и при разной концентрации тестостерона не имели статистической значимости, хотя наблюдалась выраженная тенденция к понижению при прогностически неблагоприятных случаях. У больных ДГПЖ относительный уровень мРНК ИЛ-10 был статистически значимо выше, чем у больных РПЖ. При концентрации простатспецифического антигена выше 10 нг/мл уровень мРНК ИЛ-10 был ниже, чем при его меньших концентрациях.

Заключение. У больных РПЖ и ДГПЖ в ПК обнаружен сниженный уровень мРНК ИЛ-10. Снижение более выражено при неблагоприятном течении заболеваний и, видимо, является следствием нестабильности мРНК ИЛ-10 на посттранскрипционном уровне.

Ключевые слова: рак предстательной железы, доброкачественная гиперплазия предстательной железы, мРНК ИЛ-10

Для цитирования: Коровин О.А., Алясова А.В., Ариуа Х.М. и др. Анализ уровня мРНК ИЛ-10 в периферической крови больных раком и доброкачественной гиперплазией предстательной железы. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(4):35–42. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-35-42>

Analysis of the IL-10 mRNA level in the peripheral blood of patients with cancer and benign prostatic hyperplasia

Oleg A. Korovin^{1,2}, Anna V. Alyasova², Khalil M. Arioua³, Dmitriy V. Novikov⁴, Natalya V. Krasnogorova^{1,3}, Victor V. Novikov^{3,4}

¹City Hospital No 33; 54 Lenin Ave., Nizhny Novgorod 603032, Russia;

²Privolzhsky Research Medical University; 10/1 Minin and Pozharsky pl., Nizhny Novgorod 603005, Russia;

³N.I. Lobachevsky National Research State University of Nizhny Novgorod; 23 Gagarin Ave., Nizhny Novgorod 603022, Russia;

⁴Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; 71 Malaya Yamskaya St., Nizhny Novgorod 603950, Russia

Contacts: Oleg Alexandrovich Korovin dok.kor1177@mail.ru

Background. Interleukin-10 (IL-10) is a pleiotropic cytokine with immunomodulatory properties and may inhibit tumor development and progression or stimulate tumor growth.

Aim. Analysis of the changes of the *IL-10* mRNA level in the peripheral blood (PB) of patients with prostate cancer (PC) and benign prostatic hyperplasia (BPH) in comparison with clinical and laboratory data.

Materials and methods. 63 patients with histologically confirmed PC and 52 patients with histologically confirmed BPH were under observation. The control group consisted of 30 practically healthy persons comparable in age. Determination of the relative level of *IL-10* mRNA in PB samples was performed by real-time reverse transcription polymerase chain reaction.

Results. Both in patients with PC and in patients with BPH, a statistically significant decrease in the level of *IL-10* mRNA in the PB of patients was observed in comparison with the control. In PC, the lowest levels were found in patients with a prostate-specific antigen (PSA) concentration above 10 ng/l and with a prostate volume of more than 50 cm³. Differences in the level of *IL-10* mRNA at T2 and T3 stages and at different testosterone concentrations were not statistically significant, although there was a pronounced downward trend in prognostically unfavorable cases. Patients with BPH had a relative level of *IL-10* mRNA, which was statistically significantly higher than in patients with PC. At PSA concentrations above 10 ng/mL, the level of *IL-10* mRNA was also lower than at its lower concentrations.

Conclusion. In patients with cancer and BPH, a reduced level of *IL-10* mRNA was found in the PB. The decrease is more pronounced in the unfavorable course of diseases and, apparently, is a consequence of the instability of *IL-10* mRNA at the post-transcriptional level.

Keywords: prostate cancer, benign prostatic hyperplasia, *IL-10* mRNA

For citation: Korovin O.A., Alyasova A.V., Arioua Kh.M. et al. Analysis of the *IL-10* mRNA level in the peripheral blood of patients with cancer and benign prostatic hyperplasia. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(4):35–42. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-35-42>

Введение

Интерлейкин 10 (ИЛ-10) является плеiotропным цитокином, обладает иммуномодулирующими свойствами и может ингибировать развитие и прогрессирование опухоли или стимулировать ее рост. Подчеркивается парадоксальная роль ИЛ-10 в противоопухолевом иммунитете [1]. ИЛ-10 экспрессируется широким спектром типов клеток как врожденного, так и адаптивного звена иммунной системы, включая макрофаги, моноциты, дендритные клетки, тучные клетки, эозинофилы, нейтрофилы, естественные киллеры, CD4⁺ и CD8⁺ Т- и В-клетки. Кроме того, он может продуцироваться кератиноцитами, эпителиальными клетками и некоторыми опухолевыми клетками. Диапазон клеток-респондеров также довольно широк, что обуславливает многофункциональность и разнонаправленность действия ИЛ-10 [2]. Связывание ИЛ-10 с рецептором приводит к каскаду внутриклеточных сигналов с участием янус-киназ JAK1 и TYK2 и факторов транскрипции семейства STAT [3].

Существуют противоречивые сведения об уровне ИЛ-10 в крови больных колоректальным раком, раком молочной железы, раком предстательной железы (РПЖ), что ставит под сомнение мониторинговую значимость сывороточного уровня ИЛ-10 при данных заболеваниях. Обычно уровень ИЛ-10 определяется с помощью иммуноферментного анализа. Имеются

данные как о повышении уровня ИЛ-10 в крови больных РПЖ [4, 5], так и об отсутствии изменений в его концентрации [6, 7]. Для получения дополнительной информации о роли и значимости ИЛ-10 в противоопухолевом иммунитете мы провели изучение уровня кодирующей *ИЛ-10* мРНК. В доступной литературе мы не встретили исследований, посвященных оценке изменений уровня мРНК *ИЛ-10* при РПЖ, кроме сообщения о разной частоте экспрессии мРНК *ИЛ-10* в срезах опухолей у больных РПЖ и больных с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) [8].

Целью настоящей работы послужил анализ изменений уровня мРНК *ИЛ-10* в периферической крови (ПК) больных РПЖ и ДГПЖ в сопоставлении с клинико-лабораторными данными.

Материалы и методы

Под наблюдением находились 63 больных РПЖ в возрасте от 56 до 82 лет с гистологически доказанным диагнозом заболевания, впервые поступивших в стационар и ранее не получавших противоопухолевого лечения. Все пациенты в предоперационный период обследованы в соответствии с общепринятыми стандартами для РПЖ. Группу сравнения составили 52 пациента с гистологически подтвержденной ДГПЖ в возрасте от 56 до 82 лет.

Исследование проводили согласно био- и этическим принципам, установленным Хельсинкской декларацией. Пациенты дали информированное согласие на использование их биологического материала в научном исследовании. Контрольную группу составили 30 практически здоровых лиц, сопоставимых по возрасту с обследованными больными.

Образцы ПК пациентов забирали за 1 день до выполнения оперативного вмешательства. Уровень простатспецифического антигена (ПСА) и тестостерона (ТС) определяли с использованием наборов реагентов «ОнкоИФА-общий ПСА» и «СтероидИФА-тестостерон» («АлкорБио», Россия) с помощью анализатора Alisei Q.S. (RadimDiagnostic, Италия).

Уровень мРНК *ИЛ-10* ПК определяли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени с обратной транскрипцией в реальном времени в соответствии с предложенным ранее методом [9]. С использованием набора «Рибо-преп» («ИнтерЛабСервис», Россия) из ПК больных выделяли нуклеиновую кислоту согласно рекомендациям производителя. Для удаления ДНК к 17 мкл препарата нуклеиновой кислоты, разведенного в воде, добавляли 2 мкл реакционного буфера (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) и 1 мкл (1 ед. акт.) DNase I RNase-free (Fermentas, Евросоюз). Полученную смесь инкубировали 30 мин при 37 °С. Для остановки реакции в смесь добавляли 2 мкл 50 mM ЭДТА и инкубировали 10 мин при 65 °С. Полученный препарат РНК использовали в реакции обратной транскрипции. К 12 мкл РНК добавляли 1 мкл (50 нг) статистических затравок, инкубировали 5 мин при 70 °С и помещали в лед на 5 мин. К смеси добавляли 6 мкл раствора, содержащего 4 мкл 5x реакционного буфера (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1 мкл 10 mM смеси динуклеозидтрифосфатов (дНТФ), 1 мкл 0,1 M дитиотрейтола, 1 мкл (200 ед. акт.) M-MLV RT (Invitrogen, США) и инкубировали 30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали нагреванием до 70 °С в течение 10 мин. Полученную кДНК использовали в полимеразной цепной реакции в реальном времени. Для этого в пробирку объемом 200 мкл с оптически прозрачной крышкой вносили 23 мкл реакционной смеси, содержащей 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 mM дНТФ, по 10 пг прямого, обратного праймеров и флуоресцентно меченных зондов как для мРНК исследуемого гена, так и для мРНК гена домашнего хозяйства, 5 ед. акт. полимеразы TaqF (AmplifySens, Россия). В качестве референса использовали ген домашнего хозяйства убиквитин-лигазы С (*UBC*) [10]. Первичная структура используемых праймеров и зондов, разработанных с помощью набора компьютерных программ DNASTAR Lasergene, представлена в таблице. В реакционную смесь вносили 2 мкл кДНК, пробирку помещали

в амплификатор DPrime5 («ДНК-Технология», Россия) и инкубировали при следующих температурных условиях: 94 °С – 10 мин, 45 циклов амплификации (94 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 30 с). Уровень мРНК *ИЛ-10* рассчитывали в относительных единицах по методу $\Delta\Delta CT$ с учетом эффективности реакции [11].

Первичная структура олигонуклеотидов

Primary structure of oligonucleotides

мРНК mRNA	Праймер Primer	Первичная структура (5'–3') Primary structure (5'–3')
<i>ИЛ-10</i> <i>IL-10</i>	Прямой Right	Gagatgccttcagcagagtga
	Обратный Reverse	Gtcttcaggttctccccag
	Зонд Zond	ROX-caaccaggtaaccttaagtctccagc-BHQ2
<i>UBC</i>	Прямой Right	Gcacagctagttccgtcgca
	Обратный Reverse	Tgcattgtcaagtgcgat
	Зонд Zond	Cy5-atttgggtcgcagttcttctgttggat-BHQ2

Результаты представлены в виде Me (Q_1-Q_3), где Me – медиана, Q_1 – нижний квартиль (25 %), (Q_3) – верхний квартиль (75 %). Для сравнения двух независимых групп по количественным признакам применяли двусторонний критерий Манна–Уитни (*U*), при сравнении 3 и более независимых групп использовали критерий Краскела–Уоллиса (*H*). Различия между группами считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Статистическую обработку данных и построение рисунков выполняли с помощью компьютерной программы Statistica версии 8.0 (StatSoft Inc., США).

Результаты

При РПЖ относительный уровень мРНК *ИЛ-10* в крови больных был в 2,6 раза ($p < 0,01$) ниже по сравнению с нормой (рис. 1), у больных ДГПЖ уровень мРНК *ИЛ-10* понижался в сравнении с нормой в 1,98 раза ($p < 0,01$), но статистически значимо превышал в 1,3 раза уровень мРНК *ИЛ-10* в крови больных РПЖ ($p < 0,02$).

Изучены изменения относительного уровня мРНК *ИЛ-10* в ПК больных с разным содержанием ТС. У больных РПЖ уровень мРНК *ИЛ-10* был в 1,5 раза ниже нормы ($p < 0,05$) в группе, имевшей концентрацию ТС до 5 ммоль/л. Снижение уровня мРНК *ИЛ-10* в сравнении с нормой в 2,9 раза ($p < 0,001$) наблюдалось при более высоком содержании ТС в пределах

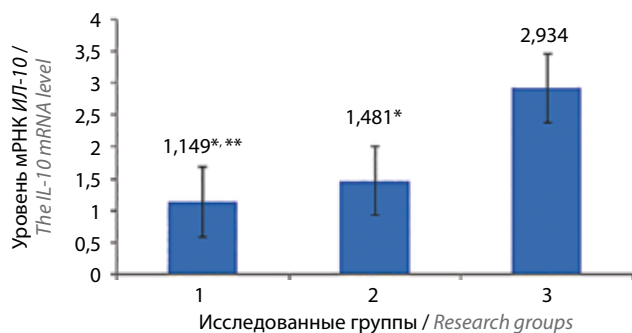


Рис. 1. Уровень мРНК ИЛ-10 в ПК больных РПЖ, ДГПЖ и здоровых лиц: 1 – группа больных РПЖ, $n = 63$; 2 – группа больных ДГПЖ, $n = 52$; 3 – группа контроля, $n = 30$; *различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$); **различия статистически значимы по сравнению с группой больных ДГПЖ ($p < 0,05$)

Fig. 1. The level of IL-10 mRNA in the peripheral blood (PB) of patients with cancer, benign prostatic hyperplasia (BPH) and healthy individuals: 1 – group of patients with prostate cancer (PC), $n = 63$; 2 – group of patients with BPH, $n = 52$; 3 – control group, $n = 30$; *differences are statistically significant compared with the control group ($p < 0,05$); **differences are statistically significant compared with the group of patients with BPH ($p < 0,05$)

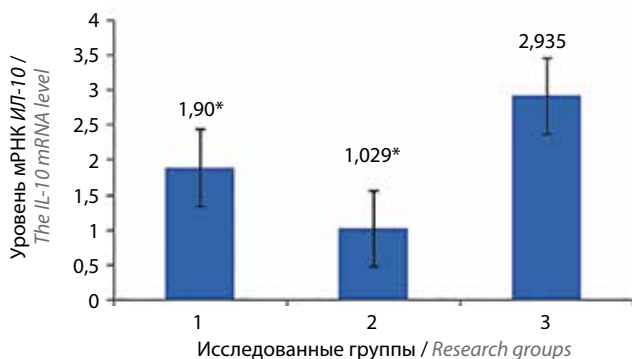


Рис. 2. Уровень мРНК ИЛ-10 в ПК больных РПЖ с разным содержанием ТС: 1 – группа больных РПЖ с уровнем ТС до 5 ммоль/л, $n = 8$; 2 – группа больных РПЖ с уровнем ТС до 15 ммоль/л, $n = 51$; 3 – группа контроля, уровень ТС $10,17 \pm 1,85$ ммоль/л, $n = 30$; *различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$)

Fig. 2. The level of IL-10 mRNA in the PB of PC patients with different level of testosterone (TS): 1 – group of patients with TS level up to 5 mmol/l, $n = 8$; 2 – group of patients with TS level up to 15 mmol/l, $n = 51$; 3 – control group, TS level $10,17 \pm 1,85$ mmol/l, $n = 30$; *differences are statistically significant compared with the control group ($p < 0,05$)

от 5 до 15 ммоль/л (рис. 2). Однако статистически значимых различий между группами не выявлено.

У больных ДГПЖ также не выявлено статистически значимых изменений в уровне мРНК ИЛ-10 между группами больных с концентрацией в крови ТС до 5 ммоль/л (Me 0,7144 [0,6192–2,519] отн. ед.) и концентрацией ТС 5–15 ммоль/л (Me 1,481 [0,3162–2,595] отн. ед.). При этом в отличие от больных РПЖ обнаруживалась выраженная тенденция к повышению уровня мРНК ИЛ-10 у больных с более высокой концентрацией ТС.

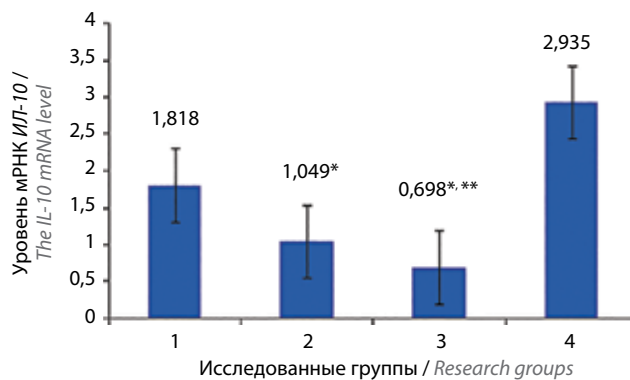


Рис. 3. Уровень мРНК ИЛ-10 в ПК больных РПЖ с разным уровнем ПСА: 1 – группа больных с уровнем ПСА до 4 нг/мл, $n = 6$; 2 – группа больных с уровнем ПСА 4–10 нг/мл, $n = 24$; 3 – группа больных с уровнем ПСА более 10 нг/мл, $n = 33$; 4 – группа контроля, уровень ПСА $2,11 \pm 0,49$ нг/мл, $n = 30$; *различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$); **различия статистически значимы по сравнению с подгруппой, имевшей ПСА до 4 нг/мл ($p < 0,05$)

Fig. 3. The level of IL-10 mRNA in the PB of PC patients with different level of prostate-specific antigen (PSA): 1 – group of patients with PSA level up to 4 ng/ml, $n = 6$; 2 – group of patients with PSA level 4–10 ng/ml, $n = 24$; 3 – group of patients with PSA level over 10 ng/ml, $n = 33$; 4 – control group, PSA level $2,11 \pm 0,49$ ng/ml, $n = 30$; *differences are statistically significant compared with the control group ($p < 0,05$); **differences are statistically significant compared with the subgroup that had PSA up to 4 ng/ml ($p < 0,05$)

Исследован уровень мРНК ИЛ-10 в крови РПЖ с разной концентрацией ПСА. Как следует из рис. 3, повышение концентрации ПСА до величин более 10 нг/мл сопровождалось прогрессирующим статистически значимым снижением уровня мРНК ИЛ-10 до значений, которые в среднем были в 4,2 раза ниже нормы ($p < 0,01$). У больных, имеющих концентрацию ПСА ниже 4 нг/мл, уровень мРНК ИЛ-10 статистически значимо отличался от данного показателя у больных с концентрацией ПСА более 10 нг/мл в 2,6 раза ($p < 0,05$).

Уровень мРНК ИЛ-10 изменялся во взаимосвязи с содержанием ПСА и при ДГПЖ, понижаясь в 5,4 раза ($p < 0,01$) от уровня нормы при концентрации ПСА более 10 нг/мл и только в 2,1 раза ($p < 0,01$) – при концентрации ПСА до 4 нг/мл (рис. 4). Различия в уровне мРНК ИЛ-10 у больных ДГПЖ, имевших концентрацию ПСА более 10 нг/мл, были статистически значимы по сравнению с больными, кровь которых содержала ПСА в меньших концентрациях.

У больных РПЖ с опухолями Т2 по классификации TNM (Tumor, Nodus, Metastasis [8-е изд., 2017]) уровень мРНК ИЛ-10 был в 2,1 раза ниже ($p < 0,01$) по сравнению со здоровыми лицами. У пациентов с опухолями Т3 уровень мРНК ИЛ-10 снижался в 3,2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с нормой (рис. 5). Статистически значимых различий между уровнями мРНК ИЛ-10 у больных с опухолями Т2 и Т3 не обнаружено.

Поражению регионарных лимфоузлов (ЛУ) сопутствовало снижение уровня мРНК *ИЛ-10* в 3,1 раза ($p > 0,05$) по сравнению с группой контроля. Отсутствие поражения ЛУ сопровождалось снижением уровня мРНК *ИЛ-10* в 2,3 раза ($p < 0,001$) по сравнению с нормой (рис. 6). Однако различия между группами больных статистически не значимы.

У больных РПЖ с простатой объемом до 25 см³ уровень мРНК *ИЛ-10* статистически значимо не отличался от нормы, при объеме простаты от 25 до 50 см³ уровень мРНК *ИЛ-10* снижался в 2,6 раза ($p < 0,01$), при объеме простаты более 50 см³ уровень мРНК *ИЛ-10* снижался в 4,5 раза ($p < 0,01$). Различия в уровне мРНК *ИЛ-10* между группами больных с разным объемом простаты были статистически не значимыми (рис. 7), но с повышением объема простаты уровень мРНК *ИЛ-10* понижался.

При ДГПЖ увеличение объема предстательной железы (ПЖ) не сопровождалось статистически значимыми изменениями уровня мРНК *ИЛ-10*. У больных с объемом ПЖ до 25 см³ тестируемый показатель равнялся 1,812 (1,236–2,564) отн. ед., при объеме ПЖ более 25 до 50 см³ он составил 1,510 (0,749–2,497) отн. ед., у лиц с объемом ПЖ более 50 см³ уровень мРНК *ИЛ-10* равен 0,879 (0,009–2,496) отн. ед. Во всех случаях сохранялись статистически значимые различия с группой контроля.

Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у больных РПЖ и ДГПЖ в крови обнаруживает-

ся пониженный в сравнении со здоровыми лицами относительный уровень мРНК *ИЛ-10*. Низкие уровни мРНК *ИЛ-10* у больных РПЖ сопутствуют увеличению объема опухоли, распространенности заболевания, росту частотности встречаемости прогностически неблагоприятных случаев заболеваемости указанными нозологиями, а также повышению в крови содержания ТС и ПСА. У больных ДГПЖ падение относительного уровня мРНК *ИЛ-10* менее выражено, но низкие уровни мРНК *ИЛ-10* также наблюдаются при высоком содержании в крови ПСА. Обнаруженное падение относительного уровня мРНК

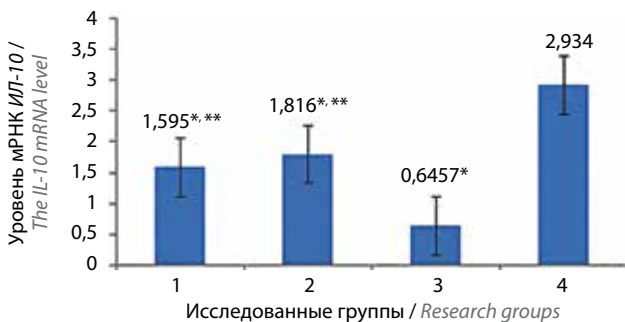


Рис. 4. Содержание мРНК *ИЛ-10* в ПК больных ДГПЖ с разным уровнем ПСА: 1 – группа с уровнем ПСА до 4 нг/мл, n = 37; 2 – группа с уровнем ПСА 4–10 нг/мл, n = 9; 3 – группа с уровнем ПСА более 10 нг/мл, n = 5; 4 – группа контроля, уровень ПСА 2,11 ± 0,49 нг/мл, n = 30; *различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,01$); **различия статистически значимы по сравнению с 3-й группой пациентов ($p < 0,01$)

Fig. 4. The content of IL-10 mRNA in the PB of patients with BPH with different levels of prostate-specific antigen: 1 – group with PSA level up to 4 ng/ml, n = 37; 2 – group with PSA level of 4–10 ng/ml, n = 9; 3 – group with PSA level of more than 10 ng/ml, n = 5; 4 – control group, PSA level 2,11 ± 0,49 ng/ml, n = 30; *differences are statistically significant compared with the control group ($p < 0,01$); **differences are statistically significant compared with the 3rd group of patients ($p < 0,01$)

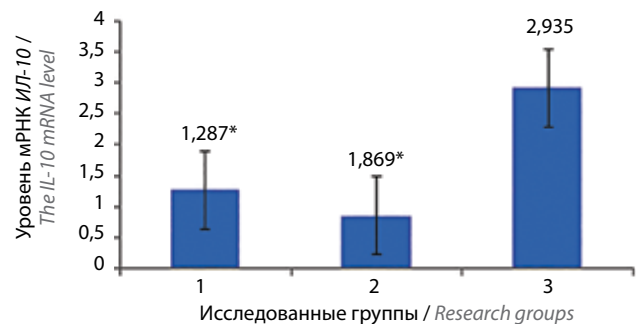


Рис. 5. Уровень мРНК *ИЛ-10* в ПК больных РПЖ с разным размером опухоли по классификации TNM: 1 – группа больных с опухолями T2, n = 36; 2 – группа больных с опухолями T3, n = 23; 3 – группа контроля, n = 30; *различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$)

Fig. 5. The level of IL-10 mRNA in the PB of PC patients with different tumor sizes according to the TNM classification: 1 – group of patients with T2 tumors, n = 36; 2 – group of patients with T3 tumors, n = 23; 3 – control group, n = 30; *differences are statistically significant compared with the control group ($p < 0,05$)

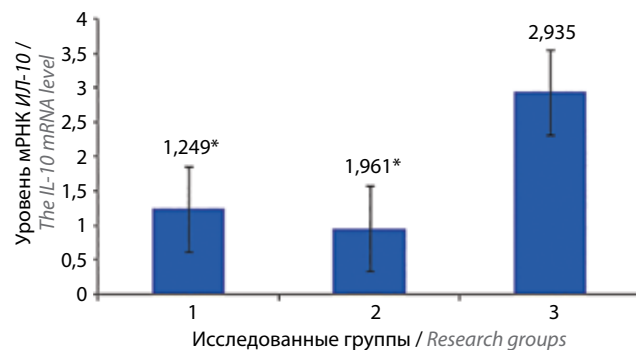


Рис. 6. Уровень мРНК *ИЛ-10* в ПК больных РПЖ с разным состоянием регионарных ЛУ: 1 – группа, имеющая поражение ЛУ, n = 11; 2 – группа, не имеющая поражения ЛУ, n = 52; 3 – группа контроля, n = 30; *различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$)

Fig. 6. The level of IL-10 mRNA in the PB of PC patients with different states of regional lymph nodes: 1 – group with lymph nodes lesion, n = 11; 2 – group without lesions of the lymph nodes, n = 52; 3 – control group, n = 30; *differences are statistically significant compared with the control group ($p < 0,05$)

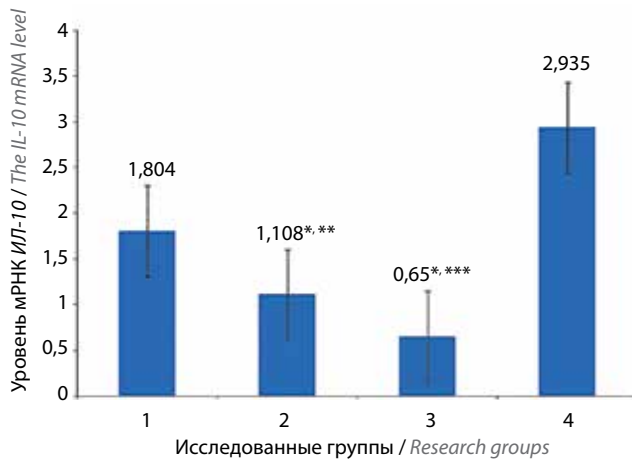


Рис. 7. Уровень мРНК ИЛ-10 в ПК больных РПЖ с разным объемом предстательной железы (ПЖ): 1 – группа с объемом ПЖ до 25 см³, n = 5; 2 – группа с объемом ПЖ более 25 до 50 см³, n = 34; 3 – группа с объемом ПЖ более 50 см³, n = 24; 4 – группа контроля, n = 30; *различия статистически значимы по сравнению с группой контроля (p < 0,01); **различия статистически значимы между группой с объемом ПЖ до 25 см³ и группой с объемом ПЖ более 25 до 50 см³ (p < 0,05); ***различия статистически значимы между группой с объемом ПЖ до 25 см³ и группой с объемом ПЖ более 50 см³ (p < 0,05)

Fig. 7. The level of IL-10 mRNA in the PB of PC patients with different prostate volume (PV): 1 – group with a PV up to 25 cm³, n = 5; 2 – group with a PV of more than 25 to 50 cm³, n = 34; 3 – group with a PV of more than 50 cm³, n = 24; 4 – control group, n = 30; *differences are statistically significant compared with the control group (p < 0,01); **differences are statistically significant between the group with a pancreatic volume of up to 25 cm³ and the group with a pancreatic volume of more than 25 to 50 cm³ (p < 0,05); ***differences are statistically significant between the group with a pancreatic volume of up to 25 cm³ and the group with a pancreatic volume of more than 50 cm³

ИЛ-10 в крови больных РПЖ и ДГПЖ, вероятно, связано с наличием у ИЛ-10 сложного регуляторного механизма, который подавляет при РПЖ синтез мРНК ИЛ-10.

Ген ИЛ-10 человека содержит 5 экзонов, 4 интрона, расположен на хромосоме 1, имеет размер ~4,7 т. п. н. Считываемая с гена мРНК ИЛ-10 несет несколько мотивов нестабильности в 3'-нетранслируемой области [12]. Промоторная область гена ИЛ-10 содержит не менее 40 полиморфных сайтов, влияющих на транскрипцию гена и обуславливающих разный риск развития опухолей. Так, полиморфизм rs1800896 гена ИЛ-10 связан со сниженным риском РПЖ, а несколько других полиморфизмов показывают значительную связь с риском РПЖ в европеоидной популяции [13, 14]. Некоторыми авторами продемонстрирован высокий уровень сывороточного ИЛ-10 при агрессивном РПЖ, а также наличие корреляции между ИЛ-10 и стадией заболевания [4, 5]. В то же время в ряде других исследований в сыворотке крови больных РПЖ не выявлено статистически значимых изменений уровня ИЛ-10 в сравнении с нормой, что ставит под сомнение мониторинговую

значимость сывороточного уровня ИЛ-10 при РПЖ [6, 7].

Известно, что количество мРНК, считываемой с одного и того же гена, распределяется по разным тканям неравномерно, и содержание белка в тканях часто не коррелирует с количеством мРНК. Это является следствием того, что регуляция экспрессии генов может осуществляться не только на уровне транскрипции, но и на посттранскрипционном уровне. Показано, что многие типы клеток экспрессируют мРНК ИЛ-10, но не все производят определяемое количество белка, и уровни экспрессии белка сильно различаются. Большая часть этих вариаций может быть объяснена посттранскрипционными механизмами. Так, множественные копии дестабилизирующих мРНК мотивов AUUUA и родственных последовательностей обнаружены в 3'-нетранслируемой области мРНК ИЛ-10, и получены доказательства их РНК-дестабилизирующей активности. При этом ИЛ-10 обладает аутоингибирующей активностью, тормозя собственный синтез за счет дестабилизации мРНК ИЛ-10 [8].

Кроме того, в регуляции экспрессии ИЛ-10 важную роль играет мРНК *hsa-miR-106a*, транскрипция которой, в свою очередь, регулируется факторами Egr1 и Sp1. Показано, что *hsa-miR-106a* снижает экспрессию ИЛ-10 за счет дегградации его мРНК. Зрелая мРНК *hsa-miR-106a* регулирует экспрессию ИЛ-10, взаимодействуя с его 3'-нетранслируемой областью. Посттранскрипционный контроль, опосредованный *hsa-miR-106a*, потенциально может участвовать в точной настройке критического уровня экспрессии ИЛ-10 контекстно-зависимым образом [15–17]. На примере колоректального рака представлено, что экспрессия *hsa-mir-106a* у онкологических больных повышена и коррелирует со стадией развития опухоли; блокада ИЛ-10 резко усиливает противоопухолевый потенциал иммунной системы; существует значительная вариабельность между пациентами в отношении экспрессии ИЛ-10, а низкие уровни ИЛ-10 связаны с более высоким риском заболевания [18–21]. Можно предположить, что *hsa-mir-106a* при РПЖ также влияет на уровень экспрессии гена ИЛ-10, приводя к снижению уровня мРНК ИЛ-10.

Ранее было показано, что низкая экспрессия ИЛ-10 в опухолевых клетках увеличивает риск неблагоприятного прогноза при раке молочной железы. Соотносительный уровень мРНК ИЛ-6/ИЛ-10 намного выше у больных раком желудка с плохим прогнозом, а средний уровень ИЛ-10 в сыворотке крови был статистически значимо ниже у пациентов с колоректальным раком, чем у здоровых лиц, что соответствует полученным нами результатам по экспрессии мРНК ИЛ-10 у больных РПЖ [22–24]. Кроме того, сообщается о том, что мыши с дефицитом ИЛ-10 более

восприимчивы к спонтанному развитию опухолей кишечника по сравнению с животными дикого типа, а низкие уровни ИЛ-10 у пожилых мужчин связаны с более высоким риском развития РПЖ [25, 26].

Таким образом, выявленное снижение относительного уровня мРНК *ИЛ-10* в крови больных РПЖ и ДГПЖ, по всей видимости, является следствием сложных иммунорегуляторных механизмов, реализуемых при патологии ПЖ и отражает различия в иммунопатогенезе данных заболеваний. Представленное исследование может рассматриваться как пилотное в связи с относительно небольшим количеством

обследованных больных, а обнаруженные изменения в содержании мРНК *ИЛ-10* потенциально могут быть использованы в мониторинговых целях.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в ПК больных РПЖ и ДГПЖ снижен относительный уровень мРНК *ИЛ-10*, что, по всей видимости, является следствием нестабильности мРНК *ИЛ-10*. Самые низкие уровни мРНК *ИЛ-10* обнаружены при высоких концентрациях в крови ПСА и других прогностически неблагоприятных показателях.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Mannino H., Ziwen Z., Xiao H. et al. The paradoxical role of *IL-10* in immunity and cancer. *Cancer Letters* 2015;367(2):103–7. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.07.009
- Xuan L., Zhang N., Wang X. et al. IL-10 family cytokines in chronic rhinosinusitis with nasal polyps: From experiments to the clinic. *Front Immunol* 2022;13:947983. DOI: 10.3389/fimmu.2022.947983
- Rasquinha M.T., Sur M., Lasrado N. et al. IL-10 as a Th2 cytokine: differences between mice and humans. *J Immunol* 2021;207(9):2205–15. DOI: 10.4049/jimmunol.2100565
- Al-Nasralla A.S.H., Hussian S.S., Tektook N.K. Immunological analysis of Interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and Prostate-specific antigen (PSA) in benign and malignant prostate cancer. *Hum Antibodies* 2023. DOI: 10.3233/HAB-220018
- Palano M.T., Gallazzi M., Cucchiara M. et al. The tumor innate immune microenvironment in prostate cancer: an overview of soluble factors and cellular effectors. *Explor Target Antitumor Ther* 2022;3(5):694–718. DOI: 10.37349/etat.2022.00108
- Katongole P., Sande O.J., Nabweyambo S. et al. IL-6 and IL-8 cytokines are associated with elevated prostate-specific antigen levels among patients with adenocarcinoma of the prostate at the Uganda Cancer Institute. *Future Oncol* 2022;18(6):661–7. DOI: 10.2217/fo-2021-0683
- Garrido M.M., Ribeiro R.M., Krüger K. et al. Are proinflammatory cytokines relevant for the diagnosis of prostate cancer? *Anticancer Res* 2021;41(6):3067–73. DOI: 10.21873/anticancer.15090
- Roya N., Fatemeh T., Faramarz M.-A. et al. Frequency of IL-10⁺CD19⁺ B cells in patients with prostate cancer compared to patients with benign prostatic hyperplasia. *Afr Health Sci* 2020;20(3):1264–72. DOI: 10.4314/ahs.v20i3.31
- Novikov D.V., Krasnogorova N.V., Gorshkova E.N. et al. Serum protein corona abolishes changes in the expression of proinflammatory genes induced by quantum dots in human blood mononuclear cell. *Bull Exp Biol Med* 2020;169(1):95–9. DOI: 10.1007/s10517-020-04832-7
- Adeola F. Normalization of gene expression by quantitative RT-PCR in human cell line: Comparison of 12 endogenous reference genes. *Ethiop J Health Sci* 2018;28(6):741–8. DOI: 10.4314/ejhs.v28i6.9
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method. *Methods* 2001;25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
- Brown C.Y., Lagnado C.A., Vadas M.A. et al. Differential regulation of the stability of cytokine mRNAs in lipopolysaccharide-activated blood monocytes in response to interleukin-10. *J Biol Chem* 1996;271(33):20108–12. DOI: 10.1074/jbc.271.33.20108
- Zhu Z.-Y., Liu J.-B., Liu X., Qian L.-X. Association of interleukin 10 rs1800896 polymorphism with susceptibility to breast cancer: a meta-analysis. *J Int Med Res* 2020;48(4):0300060520904863. DOI: 10.1177/0300060520904863
- Yadav U., Kumar P., Rai V. Interleukin-10 (IL-10) gene polymorphisms and prostate cancer susceptibility: Evidence from a meta-analysis. *Gene Reports* 2021;25:101377. DOI: 10.1101/2020.11.09.20228825
- Елисеева И.А., Ким Е.Р., Гурьянов С.Г. и др. Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1) и его функции. *Успехи биологической химии* 2011;51:65–132. Elyseeva I.A., Kim E.R., Guryanov S.G. et al. Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions. *Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances in biological chemistry* 2011;51:65–132. (In Russ.)
- Powell M.J., Thompson S.A., Tone Y. et al. Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region. *J Immunol* 2000;165(1):292–6. DOI: 10.4049/jimmunol.165.1.292
- Sharma A., Kumar M., Aich J. et al. Posttranscriptional regulation of interleukin-10 expression by hsa-miR-106a. *Proc Natl AcadSci USA* 2009;106(14):5761–6. DOI: 10.1073/pnas.0808743106
- Huang Q.-R., Pan X.B. Prognostic lncRNAs, miRNAs, and mRNAs form a competing endogenous RNA network in colon cancer. *Front Oncol* 2019;9:712. DOI: 10.3389/fonc.2019.00712
- Sullivan K.M., Jiang X., Guha P. et al. Blockade of interleukin 10 potentiates antitumor immune function in human colorectal cancer liver metastases. *Gut* 2023;72(2):325–37. DOI: 10.1136/gutjnl-2021-325808
- Townsend M.H., Felsted A.M., Piccolo S.R. et al. Metastatic colon adenocarcinoma has a significantly elevated expression of IL-10 compared with primary colon adenocarcinoma tumors. *Cancer Biol Ther* 2018;19(10):913–20. DOI: 10.1080/15384047.2017.1360453
- Borowczak J., Szczerbowski K., Maniewski M. et al. The role of inflammatory cytokines in the pathogenesis of colorectal carcinoma—recent findings and review. *Biomedicines* 2022;10(7):1670. DOI: 10.3390/biomedicines10071670
- Li Y., Yu H., Jiao S., Yang J. Prognostic value of IL-10 expression in tumor tissues of breast cancer patients. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2014;30:517–20. (In Chinese) PMID: 24796749
- Zhou L., Tang C., Li X. et al. *IL-6/IL-10* mRNA expression ratio in tumor tissues predicts prognosis in gastric cancer patients without distant metastasis. *Sci Rep* 2022;12:19427. DOI: 10.1038/s41598-022-24189-3
- Abtahi S., Davani F., Mojtahedi Z. et al. Dual association of serum interleukin-10 levels with colorectal cancer. *J Cancer Res Ther* 2017;13(2):252–6. DOI: 10.4103/0973-1482.199448

25. Krause P., Morris V., Greenbaum J.A. et al. IL-10-producing intestinal macrophages prevent excessive antibacterial innate immunity by limiting IL-23. *Synthesis Nat Commun* 2015;6:7055. DOI: 10.1038/ncomms8055
26. Thomas C.E., Bauer D.C., Yuan J.-M. et al. Circulating IL-10 is associated with reduced risk of prostate cancer in a prospective cohort of elderly men: the MrOS Study. *Cancer Causes Control* 2023;34(1):59–68. DOI: 10.1007/s10552-022-01639-x

Вклад авторов

О.А. Коровин: получение данных для анализа;
А.В. Алясова, Н.В. Красногорова: анализ полученных данных, написание текста рукописи;
Д.В. Новиков: обзор публикаций по теме статьи;
Х.М. Ариуа: получение данных для анализа;
В.В. Новиков: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи.

Author's contributions

O.A. Korovin: obtaining data for analysis;
A.V. Alyasova, N.V. Krasnogorova: obtaining data for analysis, manuscript writing;
D.V. Novikov: review of publications on the topic of the article;
Kh.M. Arioua: obtaining data for analysis;
V.V. Novikov: research design development, manuscript writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

О.А. Коровин / O.A. Korovin: <https://orcid.org/0009-0002-2326-1265>
А.В. Алясова / A.V. Alyasova: <https://orcid.org/0000-0003-2621-0359>
Д.В. Новиков / D.V. Novikov: <https://orcid.org/0000-0001-7049-6935>
Х.М. Ариуа / Kh.M. Arioua: <https://orcid.org/0000-0003-1179-2552>
Н.В. Красногорова / N.V. Krasnogorova: <https://orcid.org/0000-0002-8800-4553>
В.В. Новиков / V.V. Novikov: <https://orcid.org/0000-0002-2449-7213>

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 with out external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Работу с кровью и образцами опухолей проводили в соответствии с международными правилами работы с биологическим материалом. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The work with blood and tumor samples was carried out in accordance with the international rules for working with biological material. All patients signed informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 11.05.2023. Принята к публикации: 13.10.2023.

Article submitted: 11.05.2023. Accepted for publication: 13.10.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-43-51>

Клетки врожденного иммунитета в модели острого псориазоподобного воспаления у мышей

Э.А. Ахматова¹, Е.В. Сорокина^{1,2}, И.Ж. Шубина³, Е.А. Курбатова¹, В.Н. Столпникова¹,
Е.О. Калининченко¹, И.В. Бишева¹, С.А. Сходова¹

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5А;

²Академия постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр ФМБА России»; Россия, 125371 Москва, Волоколамское шоссе, 91;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Екатерина Вячеславовна Сорокина sorokina-cathrine@yandex.ru

Введение. Экспериментальные модели псориаза на животных помогли выяснить функции воспалительных медиаторов, раскрыть вклад врожденных или адаптивных иммунных механизмов, кератиноцитов в развитие и поддержание воспаления при псориазе.

Цель исследования – изучить субпопуляционный состав иммунных клеток крови, кожи, лимфоидных органов и сравнить 2 метода изоляции клеток из кожи.

Материалы и методы. В исследование включены 46 мышей линии C57BL/6, которые разделены на 2 группы: опытную ($n = 24$) для воспроизведения модели острого псориазоподобного дерматита с помощью имихимод-крема 5 % (62,5 мг/см²/сут/мышь, 7 дней) и контрольную ($n = 22$). Оценку тяжести воспаления кожи осуществляли по балльной шкале. На 7-й день исследовали кожу, селезенку, лимфатические узлы (ЛУ), тимус мышей. Для изоляции клеток из кожи применяли метод спонтанной миграции и ферментативной диссоциации с помощью коллагеназы. Оценку субпопуляционной структуры мононуклеарных клеток проводили методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител против соответствующих антигенов (CD3, CD4, CD8, CD5, МНС II класса, $\gamma\delta$ -TCR, CD38, CD80, CD83, CD86, TLR2). Статистическая обработка проведена при помощи программного пакета WinMDI 2.8.

Результаты. Показано, что для иммунофенотипирования $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов, дендритных клеток CD86⁺, CD83⁺, CD83⁺CD86⁺ применимы оба метода изоляции клеток кожи. Выявлено снижение экспрессии TLR2 на клетках крови и повышение на клетках ЛУ и кожи. В ЛУ, тимусе отмечено выраженное повышение числа CD38⁺, повышение $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов – в ЛУ и крови. В коже показана инфильтрация $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитами, CD8⁺- и CD38⁺-клетками.

Заключение. Острое псориазоподобное воспаление у мышей сопровождалось повышением количества $\gamma\delta$ -Т-клеток в крови, ЛУ и коже. Наблюдалась инфильтрация кожи CD8⁺- и CD38⁺-клетками. Оба метода изоляции клеток – метод спонтанной миграции и метод ферментативной диссоциации – оказались применимы для дальнейшего иммунофенотипирования.

Ключевые слова: псориаз, животные модели псориаза, имихимод

Для цитирования: Ахматова Э.А., Сорокина Е.В., Шубина И.Ж. и др. Клетки врожденного иммунитета в модели острого псориазоподобного воспаления у мышей. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(4):43–51. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-43-51>

Innate immunity cells in a model of acute psoriasis-like inflammation in mice

Elina A. Akhmatova¹, Ekaterina V. Sorokina^{1,2}, Irina Zh. Shubina³, Ekaterina A. Kurbatova¹, Vera N. Stolpnikova¹,
Evgeny O. Kalinichenko¹, Irina V. Bisheva¹, Svetlana A. Skhodova¹

¹I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums, Russian Academy of Medical Sciences; 5A Maly Kazenny lane, Moscow 105064, Russia;

²Academy of Postgraduate Education under FGBU “Federal Research and Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies of the FMBA of Russia”; 91 Volokolamskoye Shosse, Moscow 125371, Russia;

³N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia

Background. Experimental animal models of psoriasis helped to clarify the functions of inflammatory mediators, to reveal the contribution of innate or adaptive immune mechanisms, keratinocytes to the development and maintenance of inflammation in psoriasis.

Aim. To study the subpopulation composition of immune cells of blood, skin, lymphoid organs and compare two methods of isolation of cells from the skin.

Materials and methods. The study included 46 mice of the C57BL/6 line, which were divided into 2 groups: experimental ($n = 24$) to reproduce a model of acute psoriasis-like dermatitis using imiquimod cream 5 % (62.5 mg/cm²/day/mouse, 7 days) and control ($n = 22$). The severity of skin inflammation was assessed on a point scale. On the 7th day, the skin, spleen, lymph nodes, and thymus were examined. To isolate cells from the skin, the method of spontaneous migration and enzymatic dissociation using collagenase was used. The assessment of the subpopulation structure of mononuclear cells (MNCs) was carried out by flow cytometry using monoclonal antibodies against the corresponding antigens (CD3, CD4, CD5, CD8, MHC class II, TCR $\gamma\delta$, CD38, CD80, CD83, CD86, TLR2). Statistical processing was carried out using the WinMDI 2.8 software package.

Results. It has been shown that both methods of isolation of skin cells are applicable for immunophenotyping of $\gamma\delta$ T-lymphocytes, CD86⁺, CD83⁺, CD83⁺CD86⁺ dendritic cells. A decrease in TLR2 expression on blood cells and an increase in lymph node and skin cells were revealed. There was a marked increase in the number of CD38⁺ in the lymph nodes, thymus, and an increase in $\gamma\delta$ T-lymphocytes in the lymph nodes and blood. The infiltration of $\gamma\delta$ T-lymphocytes, CD8⁺ is shown in the skin and CD38⁺ cells.

Conclusion. Acute psoriasis-like inflammation of mice was accompanied by an increase in the number of $\gamma\delta$ T cells in the blood, lymph nodes and skin. Infiltration of the skin by CD8⁺ and CD38⁺ cells was observed. Both methods of cell isolation – the method of spontaneous migration and the method of enzymatic dissociation proved to be applicable for further immunophenotyping.

Keywords: psoriasis, animal models of psoriasis, imiquimod

For citation: Akhmatova E.A., Sorokina E.V., Shubina I.Zh. et al. Innate immunity cells in a model of acute psoriasis-like inflammation in mice. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(4): 43–51. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-43-51>

Введение

Изучение молекулярных механизмов индукции и развития воспаления на животных моделях позволяет оптимизировать методы лечения различных хронических воспалительных заболеваний. Одним из тяжелых воспалительных заболеваний человека является псориаз. За последние десятилетия расширилось использование животных моделей псориаза и благодаря многим из них были получены ценные данные о патогенезе заболевания. С 2009 г. одной из самых используемых моделей для изучения псориазоподобного воспаления является местное применение агониста TLR 7/8 имихимода у мышей. Воспаление, вызванное имихимодом, имитирует определенные признаки псориаза, демонстрируя развитие иммунного ответа с преобладанием Th17 и IL-23 в качестве ключевого фактора, а также значение плазмитоидных дендритных клеток в роли первичных сенсоров. Эта модель также используется в доклинических исследованиях для оценки потенциальных методов лечения и имеет два главных преимущества – простоту воспроизведения и экономичность [1–3]. Имихимод – (1-(2-метилпропил)-1H-имидазо(4,5с)хинолин-4-амин), имидазохинолин – представляет собой низкомолекулярное соединение, которое является местным иммунным модификатором ответа и активирует факторы как врожденного, так и при-

обретенного иммунитета (особенно Т-хелперы 1-го типа), вызывая противовирусное, противоопухолевое и иммунорегуляторное действие. Механизм действия имихимода включает индукцию цитокинов в коже, которые затем заставляют иммунную систему хозяина распознавать присутствие вирусной инфекции или опухоли. Имихимод является лигандом Toll-подобного рецептора 7 и мощным иммунным активатором для макрофагов, моноцитов и дендритных клеток, что приводит к секреции провоспалительных цитокинов (IFN- γ , TNF- α , IL-12) и хемокинов. Имихимод также стимулирует NK-клетки, пролиферацию В-клеток, созревание и миграцию клеток Лангерганса – основных антигенпредставляющих клеток кожи. Основные биологические эффекты имихимода опосредованы стимуляцией TLR7 и TLR8, при этом активируется транскрипционный ядерный фактор NF- κ B, что приводит к индукции медиаторов воспаления и активации иммунитета. Имихимод вызывает у мышей экспрессию в коже IL-17A, IL-17F и IL-23 и гистопатологические изменения, аналогичные изменениям в коже при псориазе у человека. Модель имихимод-индуцированного воспаления кожи также может быть использована для изучения молекулярного и клеточного патогенеза псориаза, а поиск новых мишеней и путей управления иммунным ответом при воспалении поможет приблизиться к усовершенствованию методов терапии.

Материалы и методы

Исследование проводилось на самках мышей линии C57BL/6, животные были ранжированы путем случайного распределения на 2 группы. Опытная группа ($n = 24$) – IMQ (imiquimod, имихимод) – составлена для воспроизведения модели псориазоподобного дерматита с помощью индуктора патологии, контрольная группа ($n = 22$) – животные, не получавшие препарат. За 1 день до начала исследования всем животным удаляли шерсть на отрезке площадью, примерно равной 6 см^2 ($2 \times 3 \text{ см}$), с помощью гипоаллергенного эпилирующего крема. Формирование экспериментальной патологии проведено по методу L. van der Fits и соавт. [3] с дозой индуктора патологии (крем 5 % имихимод) $62,5 \text{ мг/см}^2$ в день на каждое животное (ежедневная доза $3,125 \text{ мг}$ активного соединения) в течение 7 дней.

Визуальную оценку степени тяжести псориазоподобного воспаления кожи животных проводили перед 1-м нанесением индуктора и далее ежедневно с использованием адаптированного для мышей индекса площади поражения и тяжести псориаза (Psoriasis Area and Severity Index, PASI) [4–9], используя оценку выраженности эритемы, инфильтрации и шелушения. Степень инфильтрации кожи также оценивалась методом измерения толщины складки с помощью электронного микрометра (Milesee Technology Co., Ltd., Китай). Кровь для иммунологических исследований отбирали в пробирки с гепарином в объеме 200 мкл на 7-й день исследования. У лабораторных животных извлекали селезенку, лимфатические узлы (ЛУ) (подмышечные, паховые), тимус, а также получали биоптат кожи размерами $2 \times 2 \text{ см}$ (в месте формирования патологии, у здоровых мышей – в этой же локализации) для патологоанатомического и иммунологического исследований (иммунофенотипирование (ИФТ) методом проточной цитометрии). Для изоляции клеток из кожи применяли метод спонтанной миграции и ферментативной диссоциации с помощью коллагеназы (коллагеназа тип IV [НПП «ПанЭко», Россия]). Оценка субпулационной структуры мононуклеарных лейкоцитов (МНЛ) осуществляли методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител (eBioscience, США; Miltenyi Biotec, Германия) против соответствующих антигенов (на МНЛ селезенки, ЛУ, тимуса и кожи исследовали уровни экспрессии CD3, CD4, CD5, CD8, МНС II класса, TCR ($T\gamma\delta$), CD38, CD80, CD83, CD86, TLR2), результаты учитывали на проточном цитометре (FC-500 Beckman Coulter, США). Статистическая обработка материала проведена при помощи программного пакета WinMDI 2.8.

Результаты исследования

Воспроизведение воспаления кожи достигнуто в опытной группе к 5-му дню, и продолжало усили-

ваться до 7-го дня. Выраженность воспаления визуально оценивалась ежедневно, на 7-й день был завершён курс нанесения индуктора патологии, измеряли массу тела, толщину кожи, проведена окончательная оценка степени выраженности воспалительного процесса в коже. Выраженность эритемы, инфильтрации и шелушения составила соответственно $10 \pm 2,8$; $3,2 \pm 0,7$ и $2,4 \pm 0,8$ балла, суммарное значение индекса PASI составило $15,6 \pm 3,8$ балла, площадь пораженной кожи относительно площади нанесения индуктора патологии – $80 \pm 20,1$ %. В группе контроля выраженность эритемы составила $0,3 \pm 0,15$ балла, шелушение и суммарное значение индекса PASI – $0,3 \pm 0,47$ и $0,6 \pm 0,5$ балла соответственно.

При измерении массы тела мышей в группах на 7-й день по сравнению с 1-м днем выявлено, что в опытной группе масса тела мышей к 7-му дню составила $18,13 \pm 1,47 \text{ г}$, имела тенденцию к снижению, хотя достоверных различий не выявлено. В группе контроля масса тела мышей к 7-му дню не изменилась и составила $20,72 \pm 1,08 \text{ г}$. По данным литературы, в результате формирования данной патологии при использовании имихимода отмечено снижение веса, что связано прежде всего с обезвоживанием [10].

Толщина кожи мышей в процессе формирования патологии увеличивалась в опытной группе с $0,71 \pm 0,17$ до $1,34 \pm 0,49 \text{ мм}$. В группе контроля толщина кожи не претерпела изменений ($p < 0,05$; t -тест).

При гистологическом исследовании кожи из очага воспроизведенного дерматита в эпидермисе наблюдали явления акантоза, гиперкератоза, что обуславливает появление шелушения, в единичном случае наблюдали небольшие участки некроза в верхних отделах; в дерме выявлены периваскулярные лимфогистиоцитарные инфильтраты с примесью нейтрофилов. Толщина эпидермиса мышей с патологией превышала таковую интактных мышей в 2,5 раза ($p < 0,05$; t -тест).

При сравнении иммунофенотипа клеток крови мышей, относящихся к опытной и контрольной группам, обращает на себя внимание то, что основные различия затрагивают клетки, экспрессирующие $\gamma\delta$ -TCR. У мышей с острым воспалением $\gamma\delta$ -T-клеток больше в $\sim 4,8$ раза ($38,0 \pm 24,2$ % против $7,9 \pm 0,9$ %) по сравнению с контролем. В то же время у мышей, получавших имихимод, по сравнению с контролем число клеток МНСII⁺CD5⁻ снижено ($17,3 \pm 1,4$ % против $31,0 \pm 2,9$ % в контроле).

При ИФТ клеток, полученных из гомогенатов ЛУ мышей с острым имихимод-индуцированным воспалением, выявлено, что практически все изучаемые параметры достоверно отличались от контрольной группы. Наиболее ярко эти сдвиги видны на примере клеток с фенотипом CD38⁺ – маркером ранней активации – повышение в 21 раз ($27,6 \pm 4,1$ % против

Таблица 1. Содержание субпопуляций лейкоцитов периферической крови (ПК), ЛУ, селезенки, тимуса при развитии острого лимфноид-индуцированного воспаления (7-й день воспроизведения)

Table 1. The content of subpopulations of peripheral blood (PB) leukocytes, lymph nodes (LN), spleen, thymus in the development of acute lymphoid-induced inflammation (7th day of reproduction)

Объект An object	Группа Group	CD4 ⁺	CD4 ⁺ CD8a ⁺	CD5 ⁺	CD5 ⁺ MHC-II ⁺	MHC-II ⁺ CD5 ⁻	CD8a ⁺	γδ-TCR	CD38 ⁺	CD38 ⁺ CD80 ⁺	CD80 ⁺	CD83 ⁺	CD83 ⁺ CD86 ⁺	CD86 ⁺
		M ± σ, % клеток с экспрессией M ± σ, % of cells with expression												
Кровь Blood	Опытная Experimental	19,3 ± 2,9	0,9 ± 0,3	30,2 ± 4,2*	4,2 ± 0,8	17,3 ± 1,4*	14,8 ± 3,3*	38,0 ± 24,2*	31,9 ± 7,2	22,7 ± 8,8	27,4 ± 9,2	2,7 ± 1,2	2,9 ± 1,4	7,5 ± 3,1
	Контрольная Control	23,2 ± 4,2	0,7 ± 0,4	39,6 ± 2,7	4,4 ± 0,7	31,0 ± 2,9	20,3 ± 2,9	7,9 ± 0,9	34,6 ± 3,8	—	—	—	2,8 ± 0,7	2,4 ± 0,9
Лимфатический узел Lymph node	Опытная Experimental	48,9 ± 3,6*	50,5 ± 3,4*	60,5 ± 7,1*	4,4 ± 1,3*	22,8 ± 3,4*	58,9 ± 3,8*	82,9 ± 7,3*	27,6 ± 4,1*	23,2 ± 3,3	30,7 ± 3,7	3,0 ± 0,2*	2,4 ± 0,7*	29,7 ± 3,6*
	Контрольная Control	29,7 ± 4,2	37,1 ± 3,9	43,0 ± 3,2	2,6 ± 0,6	36,3 ± 3,8	40,6 ± 3,1	5,7 ± 0,8	1,3 ± 0,4	—	—	—	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,2
Селезенка Spleen	Опытная Experimental	32,0 ± 2,0	0,5 ± 0,4	72,0 ± 3,6*	20,6 ± 1,8*	19,7 ± 2,6*	22,3 ± 2,9*	20,1 ± 3,9*	1,7 ± 0,5*	1,8 ± 0,9	2,5 ± 0,6	0,6 ± 0,3*	0,6 ± 0,3*	8,9 ± 1,0*
	Контрольная Control	38,0 ± 3,4	0,2 ± 0,08	81,7 ± 2,3	64,9 ± 2,9	2,2 ± 0,3	43,8 ± 3,9	69,6 ± 2,3	7,2 ± 0,3	—	—	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	72,1 ± 2,3
Тимус Thymus	Опытная Experimental	50,2 ± 5,4*	37,7 ± 5,7*	80,2 ± 4,3	19,5 ± 3,4	7,1 ± 2,9	40,8 ± 4,7*	6,6 ± 1,9*	48,3 ± 5,3*	46,5 ± 6,3	72,1 ± 4,4	2,7 ± 1,1	2,7 ± 1,1	66,3 ± 6,7*
	Контрольная Control	36,0 ± 2,7	31,0 ± 1,9	—	—	10,2 ± 0,8	32,6 ± 2,2	3,6 ± 0,4	0,4 ± 0,2	—	—	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,3	27,2 ± 2,1

* $p < 0,05$ — достоверность различий между параметрами, определяемыми разными методами (U-тест Манна–Уитни).

Примечание. M — средняя арифметическая; σ — стандартное отклонение.

* $p < 0,05$ — reliability of differences between parameters determined by different methods (Mann–Whitney U test).

Note. M — arithmetic mean; σ — standard deviation.

1,3 ± 0,4 %) и клеток, экспрессирующих $\gamma\delta$ -TCR, – повышение в 14 раз (82,9 ± 7,3 % против 5,7 ± 0,8 %) (табл. 1). По сравнению с мышами из группы контроля повышенными оказались такие параметры, как CD5⁺ – в 1,4 раза (60,5 ± 7,1 % против 43,0 ± 3,2 %), CD5⁺МНСII⁺ – в 1,7 раза (4,4 ± 1,3 % против 2,6 ± 0,6 %). Острое воспаление у мышей сопровождалось повышенным накоплением в ЛУ CD4⁺-клеток – повышение в 1,6 раза (48,9 ± 3,6 % против 29,7 ± 4,2 %), CD8a⁺ – в 1,4 раза (58,9 ± 3,8 % против 40,6 ± 3,1 %) и CD4⁺CD8⁺ – в 1,4 раза (50,5 ± 3,4 % против 37,1 ± 3,9 %). У мышей с острым воспалением помимо этого увеличилось содержание клеток, несущих маркеры дендритных клеток CD83⁺ – в 2,5 раза (3,0 ± 0,2 % против 1,2 ± 0,2 %) и CD83⁺CD86⁺ – в 2 раза (2,4 ± 0,7 % против 1,2 ± 0,2 %), однако количественное содержание клеток CD86⁺ в ЛУ оказалось ниже в 1,6 раза по сравнению с таковым у мышей без воспаления (29,7 ± 3,6 % против 48,3 ± 3,7 %).

При анализе данных, полученных при исследовании селезенки, обращает на себя внимание тот факт, что у мышей с острым воспалением количество некоторых клеточных субпопуляций меньше, чем у мышей из контрольной группы. Например, клеток с фенотипом CD5⁺МНСII⁺ меньше в 3,1 раза (20,6 ± 1,8 % против 64,9 ± 2,9 %), клеток CD5⁺ – в 1,1 раза (72,0 ± 3,6 % против 81,7 ± 2,3 %). Клеток с фенотипом CD8a⁺ и CD38⁺ тоже оказалось меньше в селезенке опытных мышей в 2,0 и 4,2 раза соответственно (22,3 ± 2,9 % против 43,8 ± 3,9 %; 1,7 ± 0,5 % против 7,2 ± 0,3 %). Такая же тенденция наблюдается в отношении клеток, несущих CD86⁺ (8,9 ± 1,0 % против 72,1 ± 2,3 %) и $\gamma\delta$ -Т-клеток (20,1 ± 3,9 % против 69,6 ± 2,3 %) – снижение по сравнению с контролем в 8,0 и 3,5 раза. Клеток с фенотипом МНСII⁺CD5⁻ в селезенке мышей с воспалением было больше

в 8,0 раза (19,7 ± 2,6 % против 2,2 ± 0,3 %), а CD4⁺CD8a⁺ – в 2,5 раза (0,5 ± 0,4 % против 0,2 ± 0,08 %).

Максимальное отличие наблюдается в отношении клеток, экспрессирующих CD38⁺ – в тимусе опытных мышей их содержание достоверно выше в 120 раз (48,3 ± 5,3 % против 0,4 ± 0,2 %). Повышено также содержание клеток с фенотипом CD86⁺ (66,3 ± 6,7 % против 27,2 ± 2,1 %), $\gamma\delta$ -TCR⁺ (6,6 ± 1,9 % против 3,6 ± 0,4 %), CD4⁺ (50,2 ± 5,4 % против 36,0 ± 2,7 %) в 2,4; 1,8 и 1,4 раза соответственно.

При сравнении экспрессии TLR2 клетками периферической крови мышей показано, что у мышей, получавших имихимод, по сравнению с контролем число клеток TLR2⁺ значительно снижено в ~9,8 раза (5,3 ± 3,0 % против 51,9 ± 5,3 %). В ЛУ отмечается повышенная в 4 раза экспрессия TLR2, в селезенке – в 1,5 раза. Что касается кожи, то в очагах с воспроизведенной патологией отмечена повышенная в 2 раза экспрессия данного рецептора (табл. 2).

В коже мышей с воспалением выявлено повышенное количество клеток с фенотипом CD38⁺ (59,6 ± 5,6 % против 8,6 ± 2,7 %) и CD8a⁺ (53,8 ± 4,9 % против 11,5 ± 2,2 %) в 6,9 и 4,7 раза соответственно. Помимо этих субпопуляций, в коже были повышены уровни клеток с фенотипом МНСII⁺CD5⁻ (3,7 ± 1,0 % против 1,7 ± 0,5 %) и $\gamma\delta$ -Т-клеток (20,7 ± 3,7 % против 13,1 ± 4,5 %) в 2,2 и 1,6 раза соответственно. Однако некоторые сравниваемые параметры оказались ниже значений контрольной группы. Это относится к клеткам с фенотипом CD83⁺ (4,8 ± 0,85 против 14,5 ± 2,3 %), CD83⁺CD86⁺ (4,4 ± 1,1 % против 12,7 ± 4,7 %) и CD86⁺ (52,3 ± 4,7 % против 66,7 ± 4,1 %) – снижение по сравнению с интактными мышами в 3; 2,9 и 1,3 раза соответственно. Аналогичные изменения касаются содержания CD5⁺МНСII⁺ (2,9 ± 0,9 против 8,9 ± 2,8 %) и CD4⁺CD8a⁺ (3,6 ± 0,9 % против 6,9 ± 1,2 %) –

Таблица 2. Экспрессия TLR2 на клетках ПК, ЛУ, селезенки, тимуса и кожи при развитии острого имихимод-индуцированного воспаления (7-й день воспроизведения)

Table 2. TLR2 expression on cells of PB, LN, spleen, thymus and skin during the development of acute imiquimod-induced inflammation (7th day of reproduction)

Группа Group	ПК PB	ЛУ LN	Селезенка Spleen	Тимус Thymus	Кожа Skin
	M ± σ, % клеток с экспрессией M ± σ, % of cells with expression				
Опытная Experimental	5,3 ± 3,0*	4,6 ± 1,0*	1,8 ± 1,0*	0,6 ± 0,2	4,8 ± 0,8*
Контрольная Control	51,9 ± 5,3	0,5 ± 0,1	0,1 ± 0,05	0,2 ± 0,2	2,8 ± 0,6

* $p < 0,05$ – достоверность различий между параметрами, определяемыми разными методами (U-тест Манна–Уитни).

Примечание. M – средняя арифметическая; σ – стандартное отклонение.

* $p < 0,05$ – reliability of differences between parameters determined by different methods (Mann–Whitney U test).

Note. M – arithmetic mean; σ – standard deviation.

Таблица 3. Содержание субпопуляций лейкоцитов кожи из очагов острого имихимод-индуцированного воспаления (7-й день воспроизведения, метод изоляции клеток – диссоциация с использованием коллагеназы)

Table 3. The content of subpopulations of skin leukocytes from foci of acute imiquimod-induced inflammation (7th day of reproduction, cell isolation method – dissociation using collagenase)

Группа Group	CD4 ⁺	CD4 ⁺ CD8a ⁺	CD5 ⁺	CD5 ⁺ MHC-II ⁺	MHC-II ⁺ CD5 ⁻	CD8a ⁺	CD38 ⁺	γδ-TCR	CD38 ⁺ CD80 ⁺	CD80 ⁺	CD83 ⁺	CD83 ⁺ CD86 ⁺	CD86 ⁺
	M ± σ, %												
Опытная Experimental	5,9 ± 1,5	3,6 ± 0,9*	71,8 ± 4,4	2,9 ± 0,9*	3,7 ± 1,0*	53,8 ± 4,9*	59,6 ± 5,6*	20,7 ± 3,7*	2,8 ± 1,0	7,4 ± 0,9	4,8 ± 0,8*	4,4 ± 1,1*	52,3 ± 4,7*
Контрольная Control	–	6,9 ± 1,2	71,6 ± 19,5	8,9 ± 2,8	1,7 ± 0,5	11,5 ± 2,2	8,6 ± 2,7	13,1 ± 4,5	–	–	14,5 ± 2,3	12,7 ± 4,7	66,7 ± 4,1

* $p < 0,05$ – достоверность различий между параметрами, определяемыми разными методами (U-тест Манна–Уитни).

Примечание. M – средняя арифметическая; σ – стандартное отклонение.

* $p < 0,05$ – reliability of differences between parameters determined by different methods (Mann–Whitney U test).

Note. M – arithmetic mean; σ – standard deviation.

количество снижено в 3,0 и 1,9 раза соответственно по сравнению с контролем (табл. 3).

При изоляции клеток из кожи методом спонтанной миграции на сроках 24 ч инкубации отмечается по сравнению с методом ферментативного расщепления кожи с помощью коллагеназы повышение числа клеток с дифференцировочными маркерами CD5⁺, CD8a⁺, CD38⁺, CD86⁺ в 1,3–2 раза (табл. 4). В то же время использование коллагеназы для расщепления кожи способствовало на сроках 24 ч инкубации повышению выделения клеток с экспрессией CD4⁺ и MHC-II⁺CD5. Таким образом, вероятно, коллагеназа оказывает негативное/повреждающее влияние на маркеры активированных лимфоцитов и В-клеток CD5⁺, цитотоксических Т-лимфоцитов CD8a⁺, маркеров активации CD38⁺. При этом коллагеназа не оказала значимого действия на маркеры CD86⁺, маркеры зрелых дендритных клеток CD83⁺, CD83⁺CD86⁺, а также γδ-Т-лимфоцитов γδ-TCR и TLR2.

Показатели ИФТ клеток, полученных в процессе спонтанной миграции, существенно не различались при проведении проточной цитометрии через 24 и 72 ч. При получении суспензии клеток кожи при ферментативном переваривании коллагеназой отмечены существенные различия в числе клеток, экспрессирующих маркеры γδ-TCR, MHC-II⁺-клеток, CD8a⁺, CD5⁺, CD5⁺MHC-II⁺, а именно отмечено снижение экспрессии через 48 и 72 ч. Таким образом, для ИФТ γδ-Т-лимфоцитов, дендритных клеток CD86⁺, CD83⁺, CD83⁺CD86⁺ подходят оба из исследуемых методов выделения клеток.

При спонтанной миграции клеток из кожи не отмечено повышения числа клеток с течением времени (по сравнению с периодами 24 и 72 ч). При этом с течением времени (48 ч) при ферментативном перева-

ривании кожи коллагеназой, по всей вероятности, происходит расщепление маркеров активированных В-клеток CD5⁺, цитотоксических Т-лимфоцитов CD8a⁺, маркеров активации CD38⁺ или число этих клеток снижается.

Заключение

Таким образом, при изучении клеточного состава крови и лимфоидных органов при псориазоподобном воспалении в опытной группе (IMQ) отмечены изменения в клеточном составе МНЛ всех исследуемых лимфоидных органов. В регионарных ЛУ, тимусе и коже зарегистрировано выраженное повышение числа клеток с молекулой адгезии CD38, причем в тимусе этот показатель был выше в 120 раз по сравнению с контролем, в ЛУ – в 21 раз, в коже – в 7 раз. Роль CD38 в иммунных клетках варьируется от модуляции дифференцировки клеток до эффекторных функций при воспалении, где CD38 может регулировать аттракцию клеток, высвобождение цитокинов и доступность никотинамидадениндинуклеотида. Отсутствие единого мнения в отношении роли CD38 в индукции или, напротив, в ингибировании воспаления подчеркивает необходимость проведения дополнительных исследований для понимания биологии CD38 и его вклада в воспаление и аутоиммунитет. Изначально CD38 идентифицирован как белок, экспрессирующийся на поверхности Т-клеток, но сегодня известно, что функция CD38 выходит за рамки одного типа клеток. Именно поэтому CD38 предложен в качестве прогностического маркера при некоторых патологиях. Однако локализация CD38 на большом спектре клеток и его многочисленные функции создают трудности для понимания вклада CD38 в патологию и гомеостаз [11].

Таблица 4. Содержание субпопуляций мононуклеарных лейкоцитов и экспрессии TLR2 в зависимости от методов изоляции клеток кожи из очагов острог имихимод-индуцированного воспаления

Table 4. The content of mononuclear leukocytes subpopulations and TLR2 expression depending on the methods of isolation of skin cells from foci of acute imiquimod-induced inflammation

Метод Method	TLR2	CD4 ⁺	CD4 ⁺ CD8a ⁺	CD5 ⁺	CD5 ⁺ MHC-II ⁺	MHC- II ⁺ CD5 ⁻	γδ-TCR	CD8a ⁺	CD38 ⁺	CD83 ⁺ CD86 ⁺	CD86 ⁺	
	M ± σ, %											
Спонтанная миграция 24 ч Spontaneous migration 24 h	5,7 ± 0,7	3,6 ± 0,9	3,1 ± 0,6	67,9 ± 1,9*	2,9 ± 0,8*	4,9 ± 2,2*	69,5 ± 17,4	58,3 ± 18,7*	68,3 ± 15,5*	5,6 ± 2,4	8,2 ± 4,7	49,3 ± 9,9*
Коллагеназа 24 ч Collagenase 24 h	4,4 ± 1,0	6,8 ± 0,8	4,9 ± 0,3	35,2 ± 1,8	6,1 ± 2,3	20,4 ± 0,9	71,5 ± 2,3	32,2 ± 0,6	24,1 ± 9,1	8,9 ± 2,1	6,9 ± 0,8	35,5 ± 5,2
Контроль коллагеназа 24 ч Collagenase control 24 h	12,7 ± 4,7	—	6,9 ± 1,2	71,6 ± 19,5	8,9 ± 2,8	1,7 ± 0,5	66,7 ± 4,1	11,5 ± 2,2	8,6 ± 2,7	—	—	14,5 ± 2,3
Спонтанная миграция 72 ч Spontaneous migration 72 h	6,1 ± 0,2*	6,4 ± 0,5**	5,0 ± 0,7**	68,3 ± 8,7*	3,0 ± 0,7	3,0 ± 0,5	69,0 ± 2,5*	43,4 ± 3,2*	58,1 ± 1,6*	7,9 ± 0,7	6,5 ± 0,5	41,9 ± 1,5*
Коллагеназа 72 ч Collagenase 72 h	2,8 ± 0,6	2,7 ± 0,5	2,3 ± 0,6	26,0 ± 1,2	2,1 ± 0,3	3,0 ± 0,9	23,2 ± 6,0	22,0 ± 2,1	27,4 ± 2,6	7,1 ± 0,5	6,1 ± 0,4	36,0 ± 2,6

*p < 0,05 – достоверность различий между параметрами, определяемыми разными методами (U-тест Манна–Уитни); *p < 0,05 – достоверность различий между параметрами, определяемыми на разных сроках инкубации (Mann–Whitney U test).

Примечание. M – средняя арифметическая; σ – стандартное отклонение.

*p < 0,05 – the reliability of the differences between the parameters determined at different incubation periods (Mann–Whitney U test); *p < 0,05 – reliability of differences between parameters determined by different methods (Mann–Whitney U test).

Note. M – arithmetic mean; σ – standard deviation.

В исследуемой модели острого имихимод-индуцированного псориазоподобного воспаления отмечено повышение $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов в ЛУ и крови. В коже показана инфильтрация $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитами, CD8⁺-Т-клетками и клетками с экспрессией CD38. При изучении особенностей экспрессии Toll-подобных рецепторов в исследуемой модели показано снижение экспрессии TLR2 на клетках крови и повышение экспрессии этого рецептора клетками ЛУ и клетками кожи.

Сравнение влияния метода диссоциации кожи на изоляцию клеток показало: для ИФТ $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов, дендритных клеток CD86⁺, CD83⁺, CD83⁺CD86⁺

применимы оба исследуемых метода изоляции клеток кожи — посредством спонтанной миграции и с помощью ферментативной диссоциации с использованием коллагеназы.

В данной статье представлены результаты влияния агониста TLR 7/8 имихимода на формирование клеточного инфильтрата в коже при воспроизведении модели острого псориазоподобного воспаления у мышей, а также показано действие имихимода на состав регионарных ЛУ и системное действие на селезенку и тимус. Полученные данные указывают на необходимость дальнейших исследований в этом направлении.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Moos S., Mohebiany A.N., Waisman A., Kurschus F.C. Imiquimod-induced psoriasis in mice depends on the IL-17 signaling of keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2019;139(5):1110–7. DOI: 10.1016/j.jid.2019.01.006
2. Singh T.P., Zhang H.H., Hwang S.T., Farber J.M. IL-23- and imiquimod-induced models of experimental psoriasis in mice. *Curr Protoc Immunol* 2019;125(1):e71. DOI: 10.1002/cpim.71
3. van der Fits L., Mourits S., Voerman J.S. et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol* 2009;182(9):5836–45. DOI: 10.4049/jimmunol.0802999
4. Sun J., Zhao Y., Hu J. Curcumin inhibits imiquimod-induced psoriasis-like inflammation by inhibiting IL-1beta and IL-6 production in mice. *PLoS One* 2013;8(6):e67078. DOI: 10.1371/journal.pone.0067078
5. Di T.T., Ruan Z.T., Zhao J.X. et al. Astilbin inhibits Th17 cell differentiation and ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions in BALB/c mice via Jak3/Stat3 signaling pathway. *Int Immunopharmacol* 2016;32:32–8. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.12.035
6. Baek J.O., Byamba D., Wu W.H. et al. Assessment of an imiquimod-induced psoriatic mouse model in relation to oxidative stress. *Arch Dermatol Res* 2012;304(9):699–06. DOI: 10.1007/s00403-012-1272-y
7. Meng Y., Wang M., Xie X. et al. Paeonol ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions in BALB/c mice by inhibiting the maturation and activation of dendritic cells. *Int J Mol Med* 2017;39(5):1101–10. DOI: 10.3892/ijmm.2017.2930
8. Zhao J., Di T., Wang Y. et al. Multi-glycoside of Tripterygium wilfordii Hook. f. ameliorates imiquimod-induced skin lesions through a STAT3-dependent mechanism involving the inhibition of Th17-mediated inflammatory responses. *Int J Mol Med* 2016;38(3):747–57. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2670
9. Li Y., Zhang G., Chen M. et al. Rutaecarpine inhibited imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis via inhibiting the NF-kappaB and TLR7 pathways in mice. *Biomed Pharmacother* 2019;109:1876–83. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.062
10. Guillaume P., Lepage M., Goineau S. et al. Preclinical evaluation of anti-psoriasis activity using the imiquimod induced inflammation test in the mouse. *J Invest Dermatol* 2015;135(Suppl. 2):078.
11. Piedra-Quintero Z.L., Wilson Z., Nava P., Guerau-de-Arellano M. CD38: An immunomodulatory molecule in inflammation and autoimmunity. *Front Immunol* 2020;11:597959. DOI: 10.3389/fimmu.2020.597959

Вклад авторов

Э.А. Ахматова: анализ данных, написание текста рукописи, оформление рукописи;
 Е.В. Сорокина: дизайн исследования, написание текста рукописи, анализ рукописи;
 И.Ж. Шубина: обзор источников литературы, общая корректировка текста;
 С.А. Сходова, Е.А. Курбатова: дизайн исследования, получение данных;
 В.Н. Столпникова, Е.О. Калиниченко: получение и анализ данных;
 И.В. Бишева: анализ данных, оформление рукописи.

Authors' contribution:

E.A. Akhmatova: data analysis, manuscript writing, design of the manuscript;
 E.V. Sorokina: study design, writing the text of the manuscript, analysis of the manuscript;
 I.Zh. Shubina: literature review, text editing;
 S.A. Skhodova, E.A. Kurbatova: research design, data acquisition;
 V.N. Stolpnikova, E.O. Kalinichenko: data acquisition and analysis;
 I.V. Bisheva: data analysis, manuscript design.

ORCID авторов / ORCID of authors

Э.А. Ахматова / E.A. Akhmatova: <https://orcid.org/0000-0002-9073-5291>

Е.В. Сорокина / E.V. Sorokina: <https://orcid.org/0000-0002-1188-6578>

И.Ж. Шубина / I.Zh. Shubina: <https://orcid.org/0000-0002-9374-3158>

Е.А. Курбатова / E.A. Kurbatova: <https://orcid.org/0000-0002-0282-4471>

В.Н. Столпникова / V.N. Stolpnikova: <https://orcid.org/0000-0001-9363-2274>

Е.О. Калиниченко / E.O. Kalinichenko: <https://orcid.org/0000-0002-0048-3968>

И.В. Бишева / I.V. Bisheva: <https://orcid.org/0000-0002-8143-7356>

С.А. Сходова / S.A. Skhodova: <https://orcid.org/0000-0002-2342-9307>

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.

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 principles of bioethics. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention or the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 18.07.2023. Принята в печать: 13.10.2023.

Article received: 18.07.2023. Accepted for publication: 13.10.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-52-59>

Разработка тест-системы на основе иммуноферментного анализа для детекции рекомбинантного пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*

Е.А. Курбатова, И.В. Яковлева, Н.Ф. Гаврилова, Д.С. Воробьев, Е.С. Петухова, И.Б. Семенова, А.Е. Зайцев, Ю.В. Волох, А.Ю. Леонова, А.В. Поддубиков, А.А. Калошин, И.М. Грубер

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5А

Контакты: Екатерина Алексеевна Курбатова kurbatova6162@yandex.ru

Введение. Пневмолизин (Ply) – гемолитический токсин *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), экспрессируемый всеми штаммами пневмококка. Для его качественного и количественного определения в биологических жидкостях простым, быстрым и эффективным способом может быть использование сэндвич-ИФА (иммуноферментного анализа).

Цель исследования – разработать и оценить специфичность сэндвич-ИФА тест-системы для качественного и количественного определения рекомбинантного Ply (rPly) *S. pneumoniae*.

Материалы и методы. В качестве распознающих антител в сэндвич-ИФА использовали кроличьи поликлональные антитела (ПкАТ) к rPly, иммобилизованные на твердой фазе. К ПкАТ (rPly) прибавляли исследуемые антигены (АГ). Реакцию проявляли детектирующими мышинными моноклональными иммуноглобулинами – IgG1 (rPly) – антителами, конъюгированными с пероксидазой корня хрена. Специфичность тест-системы оценивали при использовании в качестве референс-препаратов рекомбинантного α -гемолизина (α -Hly) и водорастворимых АГ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

Результаты. С помощью сэндвич-ИФА rPly выявлен в концентрации 0,15 мкг/мл. Тест-система характеризовалась специфичностью, что подтверждено отсутствием реакции с α -Hly *S. aureus*. Референс-препараты водорастворимых поверхностных АГ штаммов *S. aureus* № 209, 1986, 1991 и Cowan I давали ложноположительную реакцию за счет присутствия в их составе протеина А (SpA) – термостабильного поверхностного белка, экспрессируемого многими штаммами стафилококка, способного связывать иммуноглобулины через Fc-фрагмент или Fab-фрагменты V₃H домена В-клеточного рецептора. Отрицательная реакция получена с АГ из штамма *S. aureus* Wood 46, не имеющего гена *sra*, кодирующего экспрессию SpA. Присутствие SpA в препаратах водорастворимых АГ *S. aureus* подтверждено в реакции ингибирования при ИФА.

Заключение. Разработан сэндвич-ИФА для качественного и количественного определения Ply *S. pneumoniae*. Проведенные исследования подтвердили специфичность тест-системы.

Ключевые слова: рекомбинантный пневмолизин, рекомбинантный α -гемолизин, моноклональное антитело, белок А, сэндвич-ИФА

Для цитирования: Курбатова Е.А., Яковлева И.В., Гаврилова Н.Ф. и др. Разработка тест-системы на основе иммуноферментного анализа для детекции рекомбинантного пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(4):52–9. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-52-59>

Development of the test system based on enzyme immunoassay for the detection of recombinant *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin

Ekaterina A. Kurbatova, Irina V. Yakovleva, Natalya F. Gavrilova, Denis S. Vorobyev, Ekaterina S. Petukhova, Irina B. Semenova, Anton E. Zaitsev, Yury V. Volokh, Anna Yu. Leonova, Alexander V. Poddubikov, Alexey A. Kaloshin, Irina M. Gruber

I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; 5A Malyy Kazenny Ln., Moscow 105064, Russia

Contacts: Ekaterina Alexeevna Kurbatova kurbatova6162@yandex.ru

Background. Pneumolysin (Ply) is a hemolytic toxin of *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) expressed by all strains of pneumococci. The use of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) can be a simple, fast and effective way of its qualitative and quantitative determination in biological fluids.

Aim. To develop and evaluate the specificity of sandwich ELISA test system for qualitative and quantitative determination of recombinant Ply (rPly) of *S. pneumoniae*.

Materials and methods. Immobilized on the solid phase rabbit's polyclonal antibodies (pAbs) to rPly were used as recognition antibodies in sandwich ELISA. The studied antigens were added to the pAbs (rPly). The reaction was manifested by using detecting mouse monoclonal IgG1 (rPly) – antibodies conjugated with horseradish root peroxidase. The specificity of the test system was evaluated when using recombinant α -hemolysin (α -Hly) and water-soluble *S. aureus* antigens as reference preparations.

Results. Using sandwich ELISA, rPly was detected at a concentration of 0.15 μ /ml. The test system was characterized by specificity, which was confirmed by the absence of reaction with recombinant α -Hly of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Reference preparations of water-soluble surface antigens of *S. aureus* strains No 209, 1986, 1991 and Cowan I gave a false positive reaction due to the presence of protein A (SpA) in their composition, a thermostable surface protein expressed by many strains of staphylococci capable of binding immunoglobulins via Fc-fragment or Fab fragments of the V₃H domain of the B cells receptor. A negative reaction was obtained with antigens from the *S. aureus* Wood 46 strain, which does not have the *spa* gene encoding SpA expression. The presence of protein A in preparations of water-soluble *S. aureus* antigens was confirmed in the ELISA inhibition assay.

Conclusion. Sandwich ELISA has been developed for qualitative and quantitative determination of *S. pneumoniae* Ply. The conducted studies have confirmed the specificity of the test system.

Keywords: recombinant pneumolysin, recombinant α -hemolysin, monoclonal antibody, protein A, sandwich ELISA

For citation: Kurbatova E.A., Yakovleva I.V., Gavrilova N.F. et al. Development of the test system based on enzyme immunoassay for the detection of recombinant *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2023;22(4):52–9. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-52-59>

Введение

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*, пневмококк) является причиной инфекционно-воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей и патологических процессов другой анатомической локализации [1]. Наряду с пневмококком в последние годы отмечают увеличение частоты и тяжести заболеваний, вызываемых *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, золотистый стафилококк). Пневмония, вызванная возбудителем *S. aureus*, протекает тяжело, требует интенсивной терапии, а смертность достигает 29 % [2].

Общим свойством *S. pneumoniae* и *S. aureus* является способность к образованию гемолитических токсинов – пневмококкового пневмолизина (Ply) и стафилококкового α -гемолизина (α -Hly). Ply и α -Hly – факторы патогенности, которые играют важную роль в патогенезе заболеваний, вызываемых этими возбудителями [3–5]; Ply *S. pneumoniae* и α -Hly *S. aureus* обладают способностью образовывать поры в мембранах эукариотических клеток, что приводит к нарушению их целостности и последующей гибели [6–8].

Экспрессируемый всеми штаммами пневмококка Ply – высококонсервативный белок с цитолитической активностью, он относится к членам семейства холестеролзависимых цитолизин, которые формируют большие поры в эукариотических клетках, имеющих холестеролсодержащие мембраны, включая клетки иммунной системы [9, 10]. Присут-

ствие Ply в мокроте [11], моче [12] и других биологических жидкостях [13, 14] может указывать на инфекцию, вызванную *S. pneumoniae*.

При проникновении *S. aureus* в организм α -Hly связывается поверхностным мембранным рецептором – протеином 10, содержащим металлопротеиназный домен (ADAM-10), и образует мелкие поры в соматических клетках, в том числе иммунных. В результате активируется сигнальный путь, приводящий к экспрессии цитокинов или гибели клеток [5, 15, 16].

Наряду с микробиологическими и молекулярно-биологическими (масс-спектрометрией, полимеразной цепной реакцией) методами детекции этих патогенов [13, 14] не утрачивает своего значения иммунологическая диагностика, основанная на определении антигенов (АГ) бактерий в биологических жидкостях [11, 12]. Использование моноклональных антител (МкАТ и АТ соответственно) в сэндвич-ИФА (иммуноферментном анализе) для определения Ply *S. pneumoniae* в биологических жидкостях может быть простым, быстрым и эффективным способом выявления этого возбудителя. При этом необходимо исключить возможные перекрестные реакции Ply *S. pneumoniae* с другими гемолитическими токсинами, в частности с α -Hly *S. aureus*.

Цель исследования – оценить специфичность сэндвич-ИФА для качественного и количественного определения рекомбинантного Ply (rPly) *S. pneumoniae*.

Материалы и методы

Рекомбинантный пневмолизин пневмококка экспрессирован в штамме *Escherichia coli* M-15/pSp-raPLY (депонирован в государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» 04.03.2020, регистрационный номер В-9016) [17, 18].

Для получения α -гемолизина (α -Hly) *S. aureus* его кодирующая последовательность встроена в плазмидный вектор pQE-30 и экспрессирована в клетках *E. coli* штамма M15 с использованием синтетического индуктора изопропил- β -галактопиранозид. Очистку r-белка осуществляли на колонке с Ni-сефарозой в 8 М буферном растворе мочевины с последующим диализом против 50 мМ буферного раствора Tris-HCl pH 9,0. *In vitro* на эритроцитах кролика подтверждена гемолитическая активность очищенного r-белка.

Водорастворимые поверхностные АГ *S. aureus* № 209, 1986, 1991, Wood 46 и Cowan I (Центр коллективного пользования ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (НИИВС им. И.И. Мечникова) при финансовой поддержке проекта Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021) получены из инактивированных ацетоном микробных клеток из расчета 40 мг сухих клеток на 1 мл дистиллированной воды. Экстракцию поверхностных АГ проводили центрифугированием при 4000 об/мин в течение 30 мин.

Мыши линии BALB/c получены из питомника ООО «СМК СТЕЗАР» (г. Владимир, Россия). Животных содержали в условиях вивария в соответствии с Руководством по содержанию и уходу за лабораторными животными (ГОСТ 33217–2014). Дизайн исследования одобрен этическим комитетом ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова».

Моноклональные АТ к rPly получали путем слияния спленоцитов мышей линии BALB/c (самки), иммунизированных rPly (25 мкг/мышь), адсорбированным на геле алюминия гидроксида (200 мкг/мышь), 3-кратно с интервалом 14 сут с клетками мышшиной миеломы P3-X63-Ag8.653. Гибридизацию проводили на 3-и сутки после последней иммунизации. Выделение иммунных спленоцитов, слияние, культивирование культур, клонирование и селекцию технологичных клонов осуществляли в соответствии с протоколом получения МкАТ [19]. Выделение МкАТ (rPly) из асцитной жидкости мышей проводили методом двукратного осаждения сульфатом аммония. Для этого к 0,5 мл асцитной жидкости добавляли 0,5 мл насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и инкубировали в течение ночи при 4 °С. Образовавшуюся взвесь центрифугировали при 5000 об/мин в течение 15 мин. Осадок растворяли в 0,5 мл 0,9 % изотоничес-

кого раствора натрия хлорида с последующим добавлением 0,5 мл насыщенного раствора сульфата аммония. Смесь инкубировали в течение 4 ч при 4 °С. Образовавшуюся взвесь центрифугировали при 5000 об/мин в течение 15 мин. Осадок растворяли в 0,5 мл 0,15 М фосфатно-солевого буфера (ФСБ) pH 7,2, диализовали против того же буфера в течение ночи при 4 °С и затем концентрировали с помощью полиэтиленгликоля с молекулярной массой 40 000 до объема 0,4 мл.

Изотип и специфичность МкАТ в супернатанте клонов и асцитической жидкости мышей определяли с помощью ИФА при использовании в качестве покрывающего лунки АГ rPly (5 мкг/мл), адсорбированного на полистироловых планшетах (Biomedicals, Россия). В качестве вторичных АТ использовали конъюгированные с пероксидазой антимышиные АТ иммуноглобулинов: IgM (μ -цепь), IgG (H+L), IgG1 (γ 1-цепь), IgG2a (γ 2a-цепь), IgG2b (γ 2b-цепь), IgG3 (γ 3-цепь) (Thermo Fisher Scientific, США). Оптическую плотность продуктов реакции определяли на микропланшетном ИФА-ридере (iMark, Япония) при длине волны 450 нм.

Моноклональные АТ rPly, меченные пероксидазой корня хрена (ПХ), получали путем перйодатного конъюгирования [20]. Для этого к 2 мг ПХ (Serva, ~1000 Ед/мг), растворенной в 0,5 мл деионизированной воды, добавляли 0,1 мл свежеприготовленного раствора 0,2 М перйодата натрия (NaIO_4) и перемешивали в течение 20 мин при 20 °С. Полученный ПХ-альдегид диализовали против 1 М натрий-ацетатного буфера pH 4,5 в течение 1 сут при 4 °С. С помощью 0,2 М карбонатного буфера доводили pH ПХ-альдегида до 9,5 и сразу добавляли 4 мг МкАТ, растворенных в 0,5 мл 0,001 М карбонатного буфера pH 9,5. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 20 °С. Далее к полученной смеси добавляли 0,05 мл свежеприготовленного раствора борогидрида натрия (NaBH_4) с концентрацией 4 мг/мл и выдерживали, периодически встряхивая, в течение 2 ч при 4 °С. Полученный конъюгат диализовали против 0,01 М ФСБ pH 7,2 в течение ночи при 4 °С. Активность конъюгата определяли с помощью ИФА при иммобилизации на твердой фазе rPly. Конъюгат стабилизировали добавлением 87 % глицерина в соотношении 1:1 и бычьего сывороточного альбумина в концентрации 5,0 мг/мл. Конъюгат хранили при температуре -18 °С.

Для получения ПкАТ (rPly) кролика 3-кратно иммунизировали rPly (разовая доза 50 мкг), адсорбированным на геле алюминия гидроксида (200 мкг). Интервал между иммунизациями составил 14 сут. Сыворотку получали на 14-е сутки после последней иммунизации. Выделение ПкАТ (rPly) проводили путем осаждения сульфатом аммония.

Для получения ПкАТ к протеину *A. S. aureus* (SpA) мышей ($n = 6$) иммунизировали двукратно внутрибрюшинно SpA (Pharmacia, Швеция) (50 мкг/мышь), адсорбированным на геле алюминия гидроксида (200 мкг). Выделение ПкАТ (SpA) проводили путем осаждения сульфатом аммония.

Содержание белка в препаратах определяли на спектрофотометре (Genesis, США) при длине волны 215 и 225 нм по формуле

$$[\text{белок}] \text{ мг/мл} = 144 (A_{215} - A_{225}) \times b,$$

где A – оптическая плотность, b – разведение пробы [21].

В препарате rPly содержание белка составило $1,5 \pm 0,1$ мг/мл, в α -Nly – $1,7 \pm 0,2$, в водорастворимых АГ в *S. aureus* – $4,5 \pm 1,8$ мг/мл, в ПкАТ (rPly) – $21,5 \pm 2,3$ мг/мл, в ПкАТ (SpA) – $14,7 \pm 1,8$ мг/мл, в МкАТ (rPly) – $9,5 \pm 1,3$ мг/мл.

Сэндвич-ИФА. Для качественного и количественного определения rPly использовали планшеты фирмы Dynatech M 129В, сенсibilизированные ПкАТ (rPly) в концентрации 5,0 мкг/мл 0,05 М карбонатного буфера рН 9,6 в объеме 100 мкл/лунка. Планшеты инкубировали в течение ночи при 4 °С, после чего отмывали 0,15 М ФСБ рН 7,2, содержащими 0,05 % Твин-20. Исследуемые образцы препаратов (рекомбинантные или природные) вносили в лунки планшетов и делали последовательные двукратные разведения. Концентрация АГ в 1-й лунке в пересчете на белок составляла 5,0 мкг/мл. Контролем служили лунки с ФСБ. Планшет инкубировали 1 ч при 37 °С, затем отмывали раствором ФСБ с 0,05 % Твин-20. Конъюгат МкАТ (rPly) – ПХ в разведении 1:2000 вносили по 100 мкл в каждую лунку планшета. Планшет инкубировали 1 ч при 37 °С, затем отмывали и вносили по 100 мкл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в каждую лунку. Инкубировали в темноте в течение 10 мин при 20 °С. Для остановки реакции использовали 1 М раствора H_2SO_4 , который вносили по 50 мкл в каждую лунку. Результаты учитывали на микропланшетном ИФА-ридере (iMark, Япония) при длине волны 450 нм.

Ингибирование сэндвич-ИФА. В 1-м варианте во все лунки планшета с иммобилизованными на их поверхности ПкАТ (rPly) вносили мышинные ПкАТ (SpA) в концентрации 5 мкг/мл и затем в растворе этих АТ титровали водорастворимые АГ *S. aureus* Cowan I, начиная с концентрации 5 мкг/мл, двукратным шагом. Во 2-м варианте вместо ПкАТ (SpA) вносили ПкАТ (rPly). Для подтверждения специфичности реакции сыворотку к SpA *S. aureus* ингибировали rPly. Все остальные этапы анализа проводили так, как описано ранее.

Статистическую обработку данных проводили методом Манна–Уитни для независимых выборок

при использовании программного обеспечения Statistica 10. Данные представлены средним значением \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Качественное и количественное определение rPly проводили с помощью сэндвич-ИФА. К иммобилизованному на планшете распознающим ПкАТ (rPly) прибавляли rPly в двукратно убывающих концентрациях начиная с 5 мкг/мл. Реакцию проявляли МкАТ (rPly) – ПХ. В качестве отрицательного контроля использовали ФСБ. МкАТ (rPly) – ПХ специфично взаимодействовали с rPly (рис. 1, а). Метод обладал достаточно высокой чувствительностью: наименьшая концентрация rPly составляла 0,15 мкг/мл. В качестве референс-препарата использовали α -Nly *S. aureus* и комплекс поверхностных водорастворимых АГ стафилококка. МкАТ (rPly) не реагировали с α -Nly стафилококка (рис. 1, б). Использование водорастворимых поверхностных АГ стафилококка в качестве референс-препаратов выявило неожиданный результат – МкАТ (rPly) – ПХ дозозависимо распознавали поверхностные АГ *S. aureus* № 209 (рис. 1, в).

Мы предположили, что такой результат может быть обусловлен взаимодействием Fc-фрагментов АТ, использованных в сэндвич-ИФА, с SpA, который продуцируют многие штаммы *S. aureus*.

Для решения этого вопроса были получены АГ из штаммов *S. aureus* № 1986, 1991, Cowan I и Wood 46, различающиеся по способности к экспрессии SpA.

Штаммы *S. aureus* № 1991 и 1986 содержали АГ, которые выявляли с помощью МкАТ (rPly) – ПХ (рис. 2, а, б). АГ, полученные из штамма *S. aureus* Wood 46, отрицательного по гену *spa*, не вступали в реакцию с МкАТ (rPly) – ПХ (рис. 2, в). Штамм *S. aureus* Cowan I, являющийся хорошим продуцентом SpA, наиболее интенсивно взаимодействовал с МкАТ (rPly) – ПХ (рис. 2, г).

Роль SpA в ложноположительных результатах сэндвич-ИФА подтверждена в реакции ингибирования при ИФА. Реакцию ингибирования связывания водорастворимых поверхностных АГ штамма *S. aureus* Cowan I с АТ проводили путем прибавления в сэндвич-систему мышинных ПкАТ к SpA (рис. 3, а) и кроличьих ПкАТ (rPly) (рис. 3, б). В обоих случаях наблюдали снижение оптической плотности продуктов реакции. Полученные данные указывают на наличие SpA в образцах поверхностных водорастворимых АГ штамма *S. aureus* Cowan I. В 3-м варианте вместо водорастворимых поверхностных АГ штамма *S. aureus* Cowan I использовали rPly, к которому прибавляли ПкАТ (SpA) (рис. 3, в). В этом случае ингибирования реакции не наблюдали.

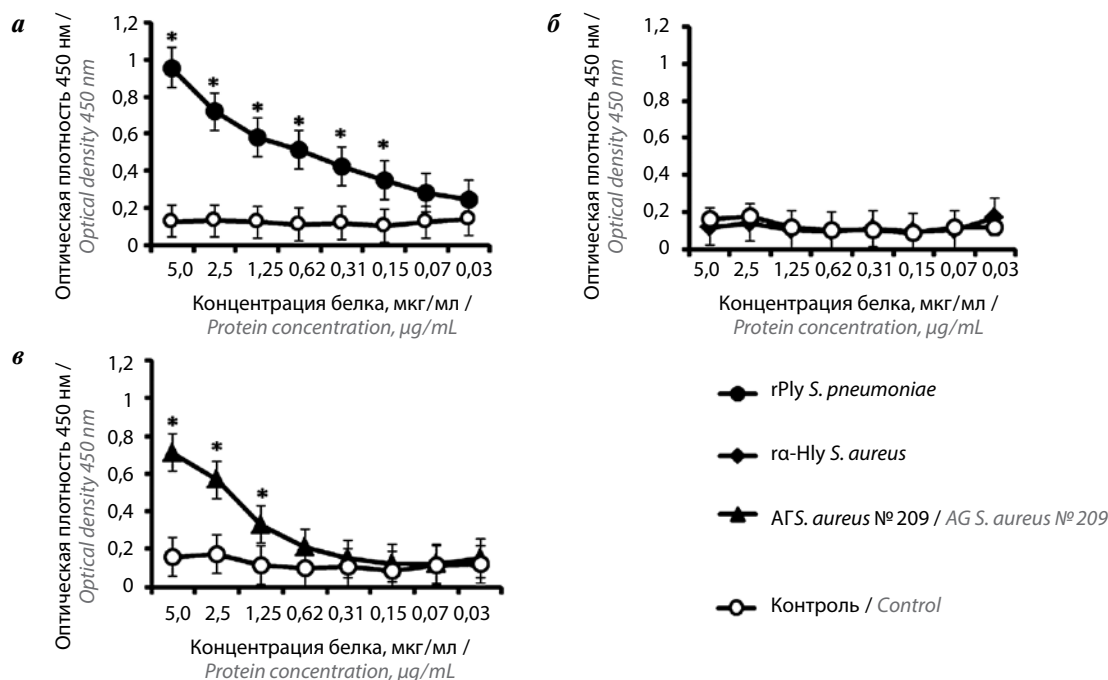


Рис. 1. Специфичность взаимодействия МкАТ (rPly) – ПХ с АГ: а – rPly; б – α -Hly *S. aureus*; в – АГ *S. aureus* № 209. Здесь и на рис. 3: МкАТ (rPly) – ПХ – моноклональные антитела к рекомбинантному пневмолизину, меченные пероксидазой корня хрена; rPly – рекомбинантный пневмолизин; α -Hly – рекомбинантный α -гемолизин. Здесь и на рис. 2, 3: АГ – водорастворимые поверхностные антигены; М – среднее значение; SD – стандартное отклонение; $M \pm SD$; * $p < 0,05$ между опытом и контролем, тест Манна–Уитни

Fig. 1. Specificity of the interaction of mAbs (rPly) – HPR with antigens: а – rPly; б – α -Hly of *S. aureus*; в – АГ of *S. aureus* No 209. Here and in fig. 3: mAbs (rPly) – HRP – monoclonal antibodies to recombinant pneumolysin labeled with horseradish root peroxidase; rPly – recombinant pneumolysin; α -Hly – recombinant α -hemolysin. Here and in figs. 2, 3: АГ – water-soluble surface antigens; М – mean value; SD – standard deviation; $M \pm SD$; * $p < 0.05$ between experience and control, Mann–Whitney test

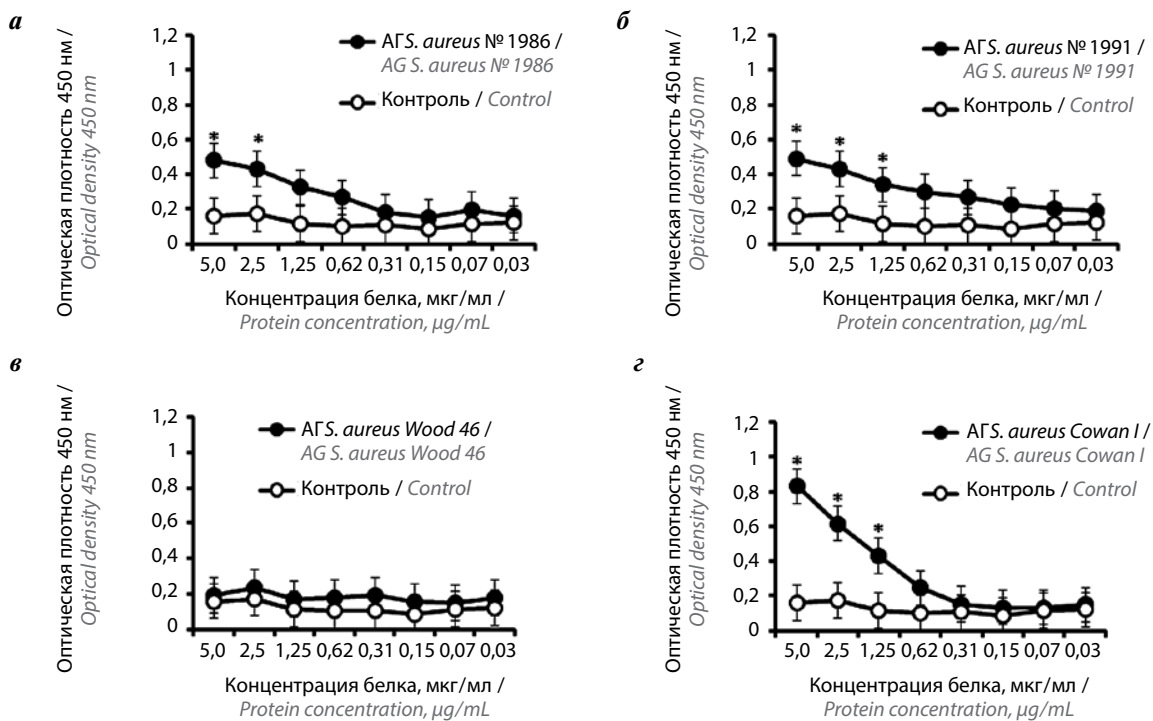


Рис. 2. Сэндвич-ИФА с поверхностными водорастворимыми АГ *S. aureus*: а – № 1986; б – № 1991; в – Wood 46; г – Cowan I

Fig. 2. Sandwich ELISA with surface water-soluble *S. aureus* antigens: а – No 1986; б – No 1991; в – Wood 46; г – Cowan I

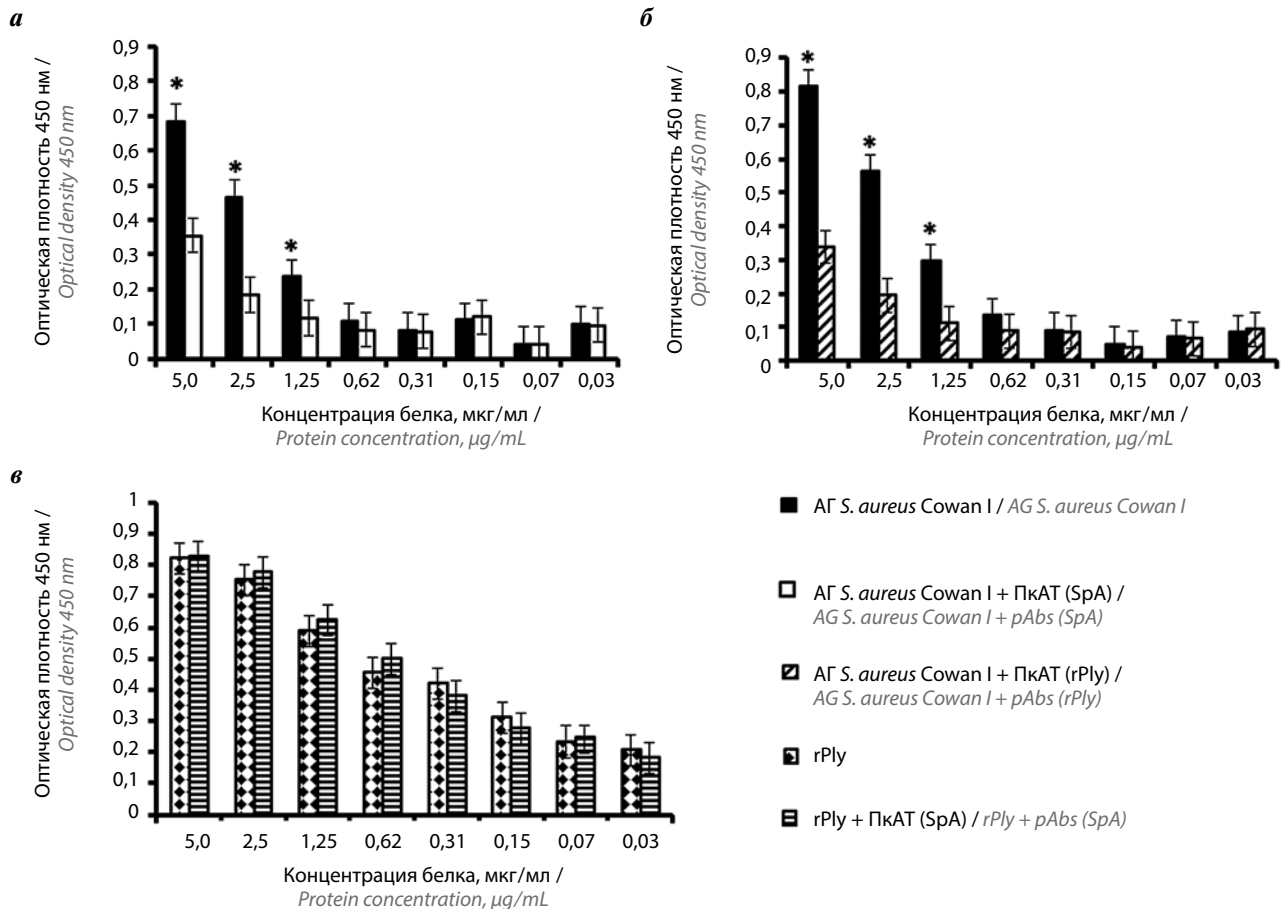


Рис. 3. Ингибирование сэндвич-ИФА. Распознающие антитела, иммобилизованные на планшете – ПкАТ (rPly); детектирующие антитела – МкАТ (rPly) – ПХ. Ингибирование: а – АГ *S. aureus* Cowan I и ПкАТ (SpA); б – АГ *S. aureus* Cowan I и ПкАТ (rPly); в – rPly и ПкАТ (SpA). ПкАТ (rPly) – поликлональные антитела к rPly; ПкАТ (SpA) – поликлональные антитела к протеину *A. S. aureus*

Fig. 3. Inhibition of sandwich ELISA. Recognizing antibodies immobilized on the plate – pAbs (rPly); detecting antibodies – mAbs (rPly) – HRP. Inhibition: a – AG of *S. aureus* Cowan I and pAbs (SpA); b – AG *S. aureus* Cowan I and pAbs (rPly); c – rPly and pAbs (SpA). pAbs (rPly) – polyclonal antibodies to rPly; pAbs (SpA) – polyclonal antibodies to *S. aureus* protein A

Полученные результаты ингибирования сэндвич-ИФА подтверждают то, что взаимодействие МкАТ (rPly) – ПХ с водными экстрактами *S. aureus*, кроме Wood 46, обусловлено присутствием в них белка А.

Обсуждение

В настоящем исследовании продемонстрирована специфичность распознающих IgG1-МкАТ (rPly) – ПХ, использованных в сэндвич-ИФА, предназначенном для качественного и количественного определения rPly пневмококка. При оценке специфичности МкАТ (rPly) – ПХ референс-препаратами служили α -Нлу и водорастворимые поверхностные АГ *S. aureus*, полученные методом водной экстракции из инaktivированных ацетоном микробных клеток.

Установлено, что МкАТ (rPly) – ПХ специфично связывали rPly *S. pneumoniae* и не реагировали с α -Нлу *S. aureus*. Препараты водорастворимых поверх-

ностных АГ *S. aureus* № 209, 1986, 1991 и Cowan I давали ложноположительную реакцию с МкАТ (rPly) – ПХ. Мы предположили, что причиной ложноположительных результатов являлось взаимодействие АТ, использованных в тест-системе, с протеином А *S. aureus* – термостабильным поверхностным белком, способным неспецифично связывать иммуноглобулины через Fc-фрагмент или Fab-фрагменты V₃H домена В-клеточного рецептора (IgM) [22, 23]. Большое количество штаммов стафилококка продуцирует протеин А, который получают путем лизиса бактериальной клетки или из супернатанта культуральной жидкости. Штамм *S. aureus* Cowan I известен как хороший продуцент белка А, а штамм Wood 46 характеризуется отсутствием гена *spa*, кодирующего экспрессию белка А [24, 25]. Соответственно, водорастворимые АГ *S. aureus* Wood 46 не взаимодействовали с МкАТ (rPly) – ПХ. Присутствие протеина А в водорастворимых препаратах стафилококка доказано

с помощью ингибирования сэндвич-ИФА. В 1-м варианте мышинные ПкАТ (SpA) специфично ингибировали связывание водорастворимых поверхностных АГ штамма стафилококка Cowan I с распознающими кроличьими ПкАТ (rPly). Во 2-м варианте поверхностные АГ стафилококка Cowan I неспецифично связывали ПкАТ (rPly), что подтверждало присутствие протеина А в составе комплекса водорастворимых поверхностных АГ стафилококка. Специфичность реакции подтверждена отсутствием ингибирования связывания rPly с кроличьими ПкАТ (rPly) при внесении в систему мышинных ПкАТ (SpA).

Продуцируемый всеми штаммами пневмококка Ply (молекулярная масса 53 кДа) является идеальным

молекулярным маркером для детекции пневмококка в биологических жидкостях. При оценке специфичности тест-систем, предназначенных для качественного и количественного определения Ply, следует критично интерпретировать результаты, полученные при использовании в качестве референс-препаратов водорастворимых АГ *S. aureus*, которые могут содержать протеин А с молекулярной массой 40–60 кДа [24].

Выводы

1. Получены МкАТ IgG1 изотипа к rPly пневмококка.
2. На основе МкАТ к rPly разработан сэндвич-ИФА для качественного и количественного определения Ply *S. pneumoniae* в биологических жидкостях.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Groud J.A., Rich H.E., Alcorn J.F. Host-pathogen interactions in gram-positive bacterial pneumonia. *Clin Microbiol Rev* 2019; 32:e00107-18. DOI: 10.1128/CMR.00107-18
2. Hageman J.C., Uyeki T.M., Francis J.S. et al. Severe community-acquired pneumonia due to *Staphylococcus aureus*, 2003-04 influenza season. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:894-9. DOI: 10.3201/eid1206.051141
3. Jahn K., Kohler T.P., Hammerschmidt S. et al. Bacterial adhesins and the pneumococcus. *Cells* 2022; 11:1121. DOI: 10.3390/cells11071121
4. Cockeran R., Anderson R., Feldman C. The role of pneumolysin in the pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* infection. *Curr Opin Infect Dis* 2022; 15(3):235-9. DOI: 10.1097/00001432-200206000-00004
5. Bubeck Wardenburg J., Bae T., Otto M. et al. Poring over pores: Alpha-hemolysin and panton-valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus pneumoniae*. *Nat Med* 2022; 13(12): 1405-6. DOI: 10.1038/nm1207-1405
6. Kebaier C., Chamberland R.R., Allen I.C. et al. *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin mediates virulence in a murine model of severe pneumonia through activation of the NLRP3 inflammasome. *J Infect Dis* 2012; 205(5):807-17. DOI: 10.1093/infdis/jir846
7. Cohen T.S., Jones-Nelson O., Hotz M. et al. *S. aureus* blocks efferocytosis of neutrophils by macrophages through the activity of its virulence factor alpha toxin. *Sci Rep* 2016; 6:35466. DOI: 10.1038/srep35466
8. Kitur K., Parker D., Nieto P. et al. Toxin-induced necroptosis is a major mechanism of *Staphylococcus aureus* lung damage. *PLoS Pathog* 2015; 11(4):e1004820. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004820
9. Mitchell T.J., Dalziel C.E. The biology of pneumolysin. *Subcell Biochem* 2014; 80:145-60. DOI: 10.1007/978-94-017-8881-6_8
10. Gingerich A.D., Mousa J.J. Diverse mechanisms of protective anti-pneumococcal antibodies. *Front Cell Infect Microbiol* 2022; 12:824788. DOI: 10.3389/fcimb.2022.824788
11. Wheeler J., Freeman R., Steward M. et al. Detection of pneumolysin in sputum. *J Med Microbiol* 1999; 48(9):863-6. DOI: 10.1099/00222615-48-9-863.8
12. Rajalakshmi B., Kanungo R., Srinivasan S., Badrinath S. Pneumolysin in urine: A rapid antigen detection method to diagnose pneumococcal pneumonia in children. *Indian J Med Microbiol* 2002; 20(4):183-6. PMID: 17657067
13. Matos J.A., Madureira D.J., Rebelo M.C. et al. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* meningitis by polymerase chain reaction amplification of the gene for pneumolysin. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(5):559-63. DOI: 10.1590/s0074-02762006000500014
14. Lahti E., Mertsola J., Kontiokari T. et al. Pneumolysin polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia and empyema in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25(12):783-9. DOI: 10.1007/s10096-006-0225-9
15. Becker R.E., Berube B.J., Sampedro G.R. Tissue-specific patterning of host innate immune responses by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *J Innate Immun* 2014; 6(5):619-631. DOI: 10.1159/000360006
16. Song L., Hobaugh M.R., Shustak C. et al. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 1996; 274(5294):1859-66. DOI: 10.1126/science.274.5294.1859
17. Воробьев Д.С., Сидоров А.В., Калошин А.А. и др. Получение рекомбинантной формы белка пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2022; 174(12):723-7. DOI: 10.47056/0365-9615-2022-174-12-723-727
Vorobyev D.S., Sidorov A.V., Kaloshin A.A. et al. Preparation a recombinant form of pneumolysin protein from *Streptococcus pneumoniae*. *Byulleten 'Eksperimental'noi Biologii i Meditsini = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2022; 174(12):723-7. (In Russ.) DOI: 10.47056/0365-9615-2022-174-12-723-727
18. Воробьев Д.С., Сидоров А.В., Калошин А.А. и др. Рекомбинантная плазмидная ДНК pSp-raPLY, кодирующая синтез рекомбинантного атоксичного белка пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*, штамм *Escherichia coli M15/pSp-raPLY* – продуцент рекомбинантной атоксичной формы пневмолизина и получение указанного белка для разработки вакцинного препарата для профилактики пневмококковых инфекций. Патент РФ №2782598 от 31.10.2022.
Vorobyev D.S., Sidorov A.V., Kaloshin A.A. et al. Recombinant plasmid DNA pSp-raPLY encoding the synthesis of recombinant atoxic pneumolysin protein *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli strain M15/pSp-raPLY* is a producer of recombinant atoxic form of pneumolysin and obtaining this protein for the development of a vaccine preparation for the prevention of pneumococcal infections. RU 2 782 598C1. (In Russ.)

19. Broecker F., Anish C., Seeberger P.H. Generation of monoclonal antibodies against defined oligosaccharide antigens. *Methods Mol Biol* 2015;1331:57–80. DOI: 10.1007/978-1-4939-2874-3_5
20. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem* 1974;22(12):1084–91. DOI: 10.1177/22.12.1084
21. Segel I.H. *Biochemical calculations: How to solve mathematical problems in general biochemistry*. New-York, London, Sydney, Toronto: John Wiley & Sons Inc., 1976; 441 p.
22. Levinson A.I., Tar L., Carafa C., Haidar M. Potent stimulus of immunoglobulin M rheumatoid factor production. *J Clin Invest* 1986;78(3):612–7. DOI: 10.1172/JCI112617
23. Falugi F., Kim H.K., Missiakas D.M., Schneewind O. The role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus*. *mBio* 2013; 4(5):e00575-13. DOI: 10.1128/mBio.00575-13
24. Rigi G., Ghaedmohammadi S., Ahmadian G.A. Comprehensive review on staphylococcal protein A (SpA): Its production and applications. *Biotechnol Appl Biochem* 2019;66(3):454–64. DOI: 10.1002/bab.1742
25. Balachandran M., Giannone R.J., Bemis D.A., Kania S.A. Molecular basis of surface anchored protein A deficiency in the *Staphylococcus aureus* strain Wood 46. *PLoS One* 2017;12(8):e0183913. DOI: 10.1371/journal.pone.0183913

Вклад авторов

Е.А. Курбатова: анализ и обобщение результатов;
 И.В. Яковлева: получение моноклональных антител;
 Н.Ф. Гаврилова: разработка сэндвич-ИФА;
 Д.С. Воробьев: получение рекомбинантного пневмолизина;
 Е.С. Петухова: статистическая обработка данных;
 И.Б. Семенова: анализ литературы по теме статьи;
 А.Е. Зайцев: получение сыворотки к протеину А;
 Ю.В. Волох: иммунизация животных;
 А.Ю. Леонова: культивирование штаммов микроорганизмов;
 А.В. Поддубиков: получение поверхностных антигенов микробных клеток;
 А.А. Калошин: получение рекомбинантного α -гемолизина;
 И.М. Грубер: характеристика штаммов микроорганизмов.

Author's contributions

E.A. Kurbatova: analysis of the data obtained and summarizing of results;
 I.V. Yakovleva: obtaining of monoclonal antibodies;
 N.F. Gavrilova: development of sandwich-ELISA;
 D.S. Vorobyev: obtaining of the recombinant pneumolysin;
 E.S. Petukhova: statistical analysis;
 I.B. Semenova: review of publications on the topic of article;
 A.E. Zaitsev: obtaining serum to protein A;
 Yu.V. Volokh: animal immunization;
 A.Yu. Leonova: cultivation of strains of microorganisms;
 A.V. Poddubikov: obtaining of surface antigens of microbial cells;
 A.A. Kaloshin: obtaining recombinant α -hemolysin;
 I.M. Gruber: characteristics of strains of microorganisms.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.А. Курбатова / E.A. Kurbatova: <https://orcid.org/0000-0002-0282-4471>
 И.В. Яковлева / I.V. Yakovleva: <https://orcid.org/0000-0001-5123-2651>
 Н.Ф. Гаврилова / N.F. Gavrilova: <https://orcid.org/0000-0001-6704-0339>
 Д.С. Воробьев / D.S. Vorobyev: <https://orcid.org/0000-0002-1926-8803>
 Е.С. Петухова / E.S. Petukhova: <https://orcid.org/0000-0003-0796-5764>
 И.Б. Семенова / I.B. Semenova: <https://orcid.org/0000-0002-6630-4838>
 А.Е. Зайцев / A.E. Zaitsev: <https://orcid.org/0000-0002-8434-231x>
 Ю.В. Волох / Yu.V. Volokh: <https://orcid.org/0000-0002-5161-4964>
 А.Ю. Леонова / A.Yu. Leonova: <https://orcid.org/0000-0002-2889-2405>
 А.В. Поддубиков / A.V. Poddubikov: <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>
 А.А. Калошин / A.A. Kaloshin: <https://orcid.org/0000-0001-8679-2421>
 И.М. Грубер / I.M. Gruber: <https://orcid.org/0000-0002-1922-4660>

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

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-25-20221.
Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation grant No 22-25-20221.

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 principles of bioethics. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 06.03.2023. **Принята в печать:** 13.10.2023.
Article received: 06.03.2023. **Accepted for publication:** 13.10.2023.

Солюбилизация производного 3-гидроксихиназолина, обладающего противоопухолевой активностью

Е. В. Санарова¹, А. В. Ланцова¹, Л. Л. Николаева^{1,2}, В. Н. Осипов¹, Д. В. Гусев¹, Л. М. Борисова¹

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

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

Контакты: Екатерина Викторовна Санарова sanarova8686@mail.ru

Введение. Повышение растворимости новых фармакологически активных субстанций – одна из главных задач фармации. Эта задача становится еще более актуальной в области создания лекарственных форм для трудно-растворимых веществ с новым механизмом действия, как в случае с производными 3-гидроксихиназолина, показавшими в опытах *in vitro* способность активировать гибель опухолевых клеток по типу ферроптоза. К таковым относится и OVF-009 – оригинальная отечественная субстанция. В связи с высокой липофильностью данного соединения предложена технология его солюбилизации с применением модифицированного касторового масла (Kolliphor® ELP, BASF, Германия), разрешенного для парентерального применения.

Цель исследования – создать модель лекарственной формы для нового гидрофобного производного хиназолина с целью оценки в дальнейшем спектра его противоопухолевой активности в опытах *in vivo*.

Материалы и методы. Субстанция OVF-009, Kolliphor® ELP, этанол 95 %, Kollidon 17 PF (BASF, Германия), гидроксид натрия, фосфатный буфер, вода для инъекций; спонтанное мицеллообразование, ультразвук, потенциометрия, динамическое светорассеяние, электрофоретический метод, метод вискозиметрии и др.

Результаты. В ходе проведения работы рассмотрены основные свойства мицеллообразующего солюбилизатора Kolliphor® ELP и его водных растворов; получены 10 модельных растворов OVF-009 на основе только Kolliphor® ELP и с добавлением этанола и Kollidon 17PF в различных концентрациях; качество полученных составов оценено по параметрам внешнего вида, прозрачности раствора, pH, стабильности во времени и переносимости лабораторными животными. В результате выбраны 2 состава, приготовленные на фосфатном буфере: состав № 5, который содержит 10 % Kolliphor® ELP и дополнительно 10 % Kollidon 17PF, и состав № 8, в котором, помимо основного солюбилизатора, добавлены 10 % этанола и 16 % Kollidon 17PF. Оба состава имеют нейтральный pH, хранятся на протяжении 24 ч и удовлетворительно переносятся лабораторными животными.

Заключение. Выбранные модельные составы для солюбилизации субстанции OVF-009 на основе Kolliphor® ELP позволили обеспечить концентрацию действующего вещества в растворе, пригодную для проведения в дальнейшем биологических экспериментов на животных.

Ключевые слова: производное хиназолина, ферроптоз, фармацевтическая разработка, солюбилизация, модель лекарственной формы

Для цитирования: Санарова Е. В., Ланцова А. В., Николаева Л. Л. и др. Солюбилизация производного 3-гидроксихиназолина, обладающего противоопухолевой активностью. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(4): 60–7. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-60-67>

Solubilization of 3-hydroxyquinazoline derivative with antitumor activity

Ekaterina V. Sanarova¹, Anna V. Lantsova¹, Ludmila L. Nikolaeva^{1,2}, Vasily N. Osipov¹, Dmitriy V. Gusev¹, Larisa M. Borisova¹

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

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

Contacts: Ekaterina Viktorovna Sanarova sanarova8686@mail.ru

Background. Increasing the solubility of new pharmacologically active substances is one of the main tasks of pharmacy. It becomes even more relevant in the field of creating dosage forms for difficult-to-solubilise substances with a new mechanism of action, as in the case of 3-hydroxyquinazoline derivatives, which have shown *in vivo* experiments the ability to activate tumour cell death by ferroptosis. This includes OVF-009 – an original domestic substance. Due to the solubility of this compound in oils, the technology of its solubilisation using modified castor oil (Kolliphor® ELP, BASF, Germany), approved for parenteral use, was proposed.

Aim. To create a model dosage form for a new hydrophobic quinazoline derivative in order to further evaluate the spectrum of its antitumour activity in *in vivo* experiments.

Materials and methods. OVF-009, Kolliphor® ELP, 95 % ethanol, Kollidon 17 PF (BASF, Germany), sodium hydroxide, phosphate buffer, water for injection; spontaneous micelle formation, ultrasound, potentiometry, dynamic light scattering, electrophoretic method, viscometry method, etc.

Results. The main properties of micelle-forming solubiliser Kolliphor® ELP and its aqueous solutions were considered; 10 model solutions OVF-009 based only on Kolliphor® ELP and with addition of ethanol and Kollidon 17PF in different concentrations were obtained; the quality of the obtained compositions was evaluated by parameters – appearance, solution transparency, pH, stability over time and tolerability by laboratory animals. As a result, two formulations prepared on phosphate buffer were chosen: formulation No 5, which contains 10 % Kolliphor® ELP and additionally 10 % polyvinylpyrrolidone, and formulation No 8, in which in addition to the main solubiliser 10 % ethanol and 16 % polyvinylpyrrolidone were added. Both formulations have neutral pH, can be stored for 24 h and are tolerated by laboratory animals.

Conclusion. The selected model compositions for solubilisation of the substance OVF-009 on the basis of Kolliphor® ELP allowed to provide the concentration of the active substance in the solution suitable for further biological experiments on animals.

Keywords: quinazoline derivative, ferroptosis, pharmaceutical development, solubilization, dosage form model

For citation: Sanarova E.V., Lantsova A.V., Nikolaeva L.L. et al. Solubilization of 3-hydroxyquinazoline derivative with antitumor activity. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2023;22(4):60–7. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-60-67>

Введение

Явление ферроптоза (ФП) – железозависимой программируемой гибели клетки – обнаружено в 2012 г. [1–4]. К настоящему времени синтезирован ряд субстанций, индуцирующих ФП в опухолевых клетках, но нет ни одного зарегистрированного препарата на их основе, хотя над этим работают ученые во многих странах мира, в том числе и в России. В лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России ведется работа по синтезу целого ряда перспективных индукторов ФП, являющихся по химической природе производными 3-гидроксихиназолина (ПГХ). Синтезированные соединения, входящие в эту группу, показали в предварительных опытах *in vitro* достаточно высокую цитотоксическую активность и способность индуцировать ФП, у соединения OVF-009 эти показатели были выше, чем у эталонного вещества – эрастина [5–7]. Исследование эрастина и его аналогов *in vivo* в настоящее время лимитировано низкой биодоступностью соединений, обусловленной неспособностью их растворяться в воде. В литературе исследователями не акцентируется вопрос о способах растворения эрастина [8, 9].

В нашей работе на этапе изучения OVF-009 – при проведении опытов *in vivo* – возникли трудности, связанные с нерастворимостью нового соединения

в воде и водных растворителях. Оказалось, что данное соединение растворяется только в органических растворителях, таких как этилацетат, хлороформ, ацетонитрил, диметилформамид, диметилсульфоксид (ДМСО), этанол, и различных маслах. В связи с этим необходимо было подобрать адекватный солюбилизатор или комплекс солюбилизаторов для возможности парентерального введения ПГХ в организм.

В настоящее время в фармацевтической технологии существует множество методов солюбилизации [10, 11]. Они включают применение поверхностно-активных веществ, комплексообразователей [12–15], введение в состав органических растворителей [16], получение систем доставки [17] и мн. др. В нашем случае способность OVF-009 растворяться в растительном масле позволила выдвинуть гипотезу о возможной эффективности применения полиоксил-35-касторового масла (макрогола глицерилрицинолеат, Kolliphor® ELP, BASF, Германия) для солюбилизации этого соединения. Kolliphor® ELP представляет собой высоко очищенное вспомогательное вещество с низким содержанием воды (<0,5 %), свободных жирных кислот (<1 %), пальмитиновой, олеиновой кислот и других, что позволяет применять его для получения парентеральных лекарственных форм, и при этом обладает мицеллообразующим механизмом солюбилизации [18, 19].

Сегодня существует ряд противоопухолевых препаратов, содержащих в составе в качестве солюбилизатора макромолекулы глицерилрицинолеат, например Таксол®, Абитаксел, Интаксел, Икземпра® и др. В препарате Таксол®, выпускаемом в виде концентрата для приготовления раствора для инфузий, в 1 мл содержится паклитаксела 6 мг, макромолекулы глицерилрицинолеата – 527 мг и этанола – 396 мг. Перед введением препарат разбавляют до концентрации 0,3–1,2 мг/мл (5–20 раз) одним из предложенных растворителей (0,9 % раствором натрия хлорида, 5 % раствором декстрозы и др.). Причем приготовленные растворы могут опалесцировать из-за присутствующей в составе лекарственной формы основы-носителя – макромолекулы глицерилрицинолеата.

В препарате Икземпра®, выпускаемом в виде лиофилизата для приготовления раствора для инфузий в 2 флаконах, в 1 флаконе содержится иксабепилона 15 мг и прилагаемый растворитель, содержащий в 1 флаконе макромолекулы глицерилрицинолеата 4,0 мл и этанола 4,0 мл. Перед введением хранившиеся в холодильнике флаконы с лиофилизатом и растворителем выдерживают при комнатной температуре приблизительно 30 мин (вначале во флаконе с растворителем может наблюдаться помутнение, которое исчезает при достижении необходимой температуры). Растворитель и лиофилизат объединяют с получением раствора с концентрацией иксабепилона 2 мг/мл, а перед введением пациенту восстановленный раствор разводят инфузионным раствором с pH от 6,0 до 9,0 (например, растворами Рингера лактата или Рингера ацетата) с получением конечного раствора с концентрацией от 0,2 до 0,6 мг/мл (разведение в 3–10 раз), который стабилен в течение 6 ч при комнатной температуре.

Основываясь на имеющемся опыте применения макромолекулы глицерилрицинолеата как вспомогательного вещества нами принято решение об изготовлении модельных растворов OVF-009 с применением только этого солюбилизатора либо в комплексе с другими соразвителями (спиртом этиловым, поливинилпирролидоном [ПВП] марки Kollidon 17PF [BASF, Германия]).

Цель исследования – создать модель лекарственной формы для нового гидрофобного ПГХ с целью оценки в дальнейшем спектра его противоопухолевой активности в опытах *in vivo*.

Материалы и методы

Объект исследования. В качестве объекта исследования выбрана оригинальная субстанция OVF-009 (лаборатория химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, РФ), представляющая собой внешне белый кристаллический порошок без запаха с температурой плавления

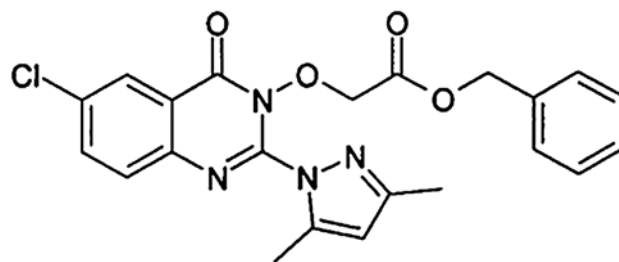


Рис. 1. Структурная формула OVF-009

Fig. 1. Structural formula OVF-009

95 °С; химическое название – бензил2-((3,5-диметил-1Н-пиразол-1-ил)-6-хлор-4-оксохиназолин-3(4Н)-ил)окси)ацетат (рис. 1 [7]). Данное вещество нерастворимо в воде, но обладает растворимостью в маслах, ацетоне, ДМСО, этаноле.

Солюбилизатор Kolliphor® ELP, получение водных растворов на его основе и их оценка. Для эффективной солюбилизации OVF-009 выбран солюбилизатор – Kolliphor® ELP, представляющий собой полиоксиэтилированное касторовое масло и разрешенный для парентерального применения. Внешне данное вспомогательное вещество представляет собой (при комнатной температуре) вязкую желтоватую прозрачную жидкость с характерным запахом.

Водные растворы солюбилизатора в концентрациях 10–25 % получали путем разбавления отвешенных количеств Kolliphor® ELP водой для инъекций (ФС.2.2.0019.15). Полученные растворы оценивали по показателям: внешний вид; значение pH определяли потенциометрически на pH-метре HANNA pH 2211 (Hanna Instruments, Румыния); динамическую вязкость – на вискозиметре Vibro Viscometer SV10 (AND, Япония); размер мицелл с указанием индекса полидисперсности – методом динамического светорассеяния, а ζ-потенциал (заряд частиц) – электрофоретическим методом на анализаторе Zetasizer Nano ZS 3600 (Malvern, Великобритания) с использованием стандартного протокола исследования.

Получение солюбилизаторов на основе Kolliphor® ELP. Получение солюбилизаторов с OVF-009 проводили на основе составов, представленных в табл. 1. Модельные растворы № 1 и 2 с использованием для солюбилизации только Kolliphor® ELP получали методом спонтанного мицеллообразования путем прямого смешения субстанции с солюбилизатором и нагреванием до 60 °С на магнитной мешалке с подогревом MR Hei-Standard (Heildolph, Германия), с последующим доведением объема раствора водой для инъекций (рис. 2, I). Модельные растворы № 3 и 4 получали по такой же технологии, но с добавлением этилового спирта на 1-м этапе (рис. 2, II). Модельные растворы № 5, 6, 9 получали путем прямого смешения субстанции с Kolliphor® ELP и нагреванием

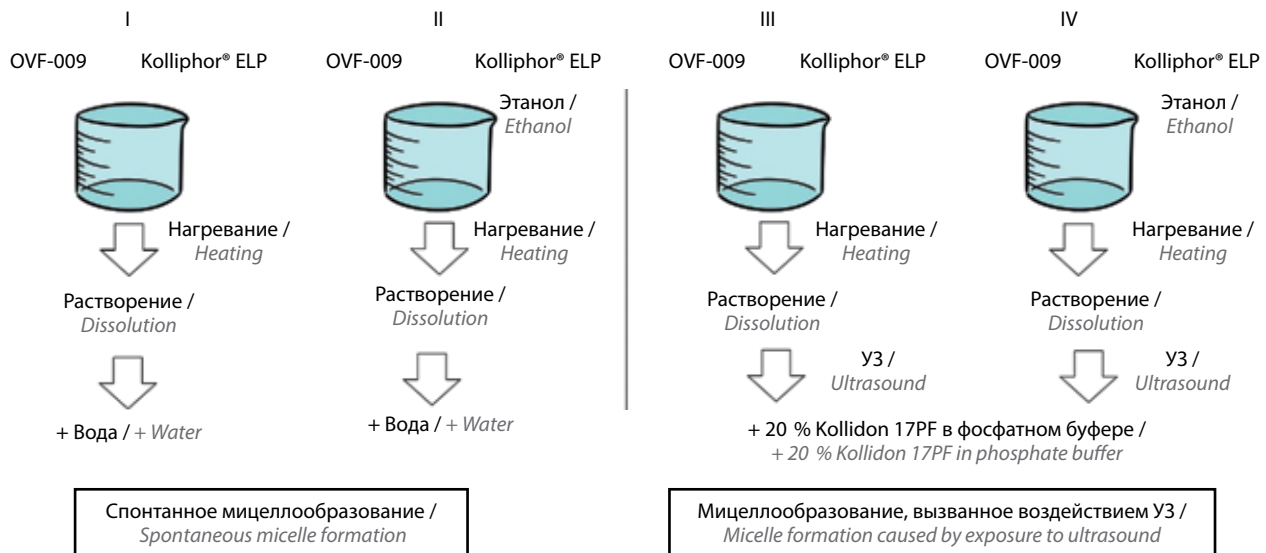


Рис. 2. Схематическая технология получения модельных растворов OVF-009

Fig. 2. Schematic technology for preparation of model solutions OVF-009

до 60 °С на магнитной мешалке с подогревом, с последующим доведением объема раствора 20 % раствором ПВП марки Kollidon 17PF (BASF, Германия) в фосфатном буфере (рис. 2, III) и помещением в ультразвуковую (УЗ) ванну (Cole-Parmer 8853, США) на 2 мин. В состав № 6 на последнем этапе добавляли 1 % NaOH (до pH 9) с целью оценить влияние щелочной среды на стабильность раствора. Модельные растворы № 7, 8, 10 получали по такой же технологии, но с добавлением этилового спирта на 1-м этапе (рис. 2, IV).

Оценка солюбилизаторов на основе Kolliphor® ELP. Полученные составы оценивались первоначально по параметрам «внешний вид» и «прозрачность (полнота растворения)/отсутствие осадка», а затем для прозрачных растворов без осадка оценивали значение pH и стабильность в процессе хранения (в условиях комнатной температуры, при освещении). Растворы, стабильные более 1 ч, передавали в лабораторию экспериментальной химиотерапии для оценки переносимости интактными лабораторными животными в дозе 50 мг/кг.

Результаты

Фармацевтическая разработка для вновь синтезированной субстанции, обладающей потенциальной фармакологической активностью, включает ряд обязательных этапов: научное обоснование выбора рациональной лекарственной формы для активной фармацевтической субстанции, разработку состава и его обоснование, стандартизацию, исследование стабильности и др. Нами проведен этап фармацевтической разработки, включающий разработку состава лекарственной формы, для новой отечественной

субстанции OVF-009, показавшей фармакологическую активность в опытах *in vitro*.

Первоначально изучили свойства выбранного солюбилизатора Kolliphor® ELP и его водных растворов в наиболее часто применяемых концентрациях 10–25 % масс (табл. 2). В результате показано, что в концентрациях 10–20 % данный солюбилизатор в водном растворе формирует одиночные мицеллы (с размером примерно 10 нм), слабо отрицательно заряженные. В концентрации 25 % начинается укрупнение частиц и повышение вязкости раствора, что неприемлемо технологически. Кроме того, выяснили, что получаемые растворы имели кислотное значение pH, степень влияния которого на солюбилизацию и стабильность OVF-009 оценена ниже.

Исходя из полученных данных разработаны технология спонтанного мицеллообразования для субстанции OVF-009 с применением Kolliphor® ELP и технология с применением УЗ для потенцирования образования мицелл (рис. 2). В ходе оценки 10 полученных модельных растворов по ключевым критериям (табл. 3), таким как внешний вид раствора, прозрачность, pH, стабильность во времени, первоначально удалось отобрать 5 моделей (составы № 1, 2, 5, 6, 8). Все эти составы прошли проверку на переносимость лабораторными животными. Первые 2 состава, полученные на основе только солюбилизатора и воды при спонтанном мицеллообразовании, имели хорошие показатели стабильности при значении pH на уровне 4,5. Однако при переходе к опытам на животных с перевитыми опухолями данные растворы, которые вводили внутривенно в дозе 50 мг/кг, были малоэффективны (торможение роста опухоли менее 20 % – неопубликованные данные). Это может

Таблица 1. Составы модельных растворов OVF-009

Table 1. Compositions of model solutions OVF-009

Состав Composition	Содержание, % Content, %						
	OVF-009	Kolliphor® ELP	Спирт этиловый Ethanol	ПВП Polyvinyl- pyrrolidone	1 % NaOH	Вода для инъекций Water for injection	Фосфатный буфер Phosphate buffer
1	0,20	15,0	—	—	—	До 100,0	—
2	0,25	20,0	—	—	—	До 100,0	—
3	0,20	10,0	5,0	—	—	До 100,0	—
4	0,25	20,0	5,0	—	—	До 100,0	—
5	0,25	9,0	—	10,0	—	—	До 100,0
6	0,2	6,0	—	16,0	0,0004	—	До 100,0
7	0,2	7,5	7,5	17,0	—	—	До 100,0
8	0,25	10,0	10,0	16,0	—	—	До 100,0
9	0,2	5,0	—	8,0	—	—	До 100,0
10	0,2	5,5	8,0	15,0	—	—	До 100,0

Таблица 2. Свойства Kolliphor® ELP и его водных растворов

Table 2. Properties of Kolliphor® ELP and its aqueous solutions

Образец Sample	Внешний вид Appearance	pH при 22 °C pH at 22 °C	Вязкость при 22 °C, мПА*с Viscosity at 22 °C, mPa*s	Размер частиц, нм/ин- декс полидисперсности Particle size, nm/polydispersity index	ζ-потенциал, мВ ζ-potential, mV
«Чистый» Kolliphor® ELP “Clean” Kolliphor® ELP	Желтоватая вязкая жид- кость Yellowish viscous liquid	—	830	—	—
10 % водный раствор Kolliphor® ELP 10 % aqueous solution of Kolliphor® ELP	Желтова- тый раствор с опалесцен- цией Yellowish solution with opalescence	4,9	2	11/0,100	–3,99
15 % водный раствор Kolliphor® ELP 15 % aqueous solution of Kolliphor® ELP		4,5	3	11/0,222	–2,76
20 % водный раствор Kolliphor® ELP 20 % aqueous solution of Kolliphor® ELP		4,5	4	14/0,333	–2,39
25 % водный раствор Kolliphor® ELP 25 % aqueous solution of Kolliphor® ELP		4,5	12	39/0,250	–1,13

Таблица 3. Оценка качества модельных растворов OVF-009

Table 3. Quality assessment of model solutions OVF-009

Состав Composition	Оцениваемый параметр Estimated parameter				
	Внешний вид Appearance	Прозрачность/осадок Transparency/precipitation	pH	Стабильность во времени Stability in time	Переносимость лабораторными животными Tolerance in laboratory animals
1	Бесцветный раствор Colorless solution	Прозрачный раствор Transparent solution	4,5	Через 24 ч выпал белый осадок After 24 h, a white precipitate precipitated	Животные живы, поведение адекватное The animals are alive, behavior is adequate
2	Бесцветный раствор Colorless solution	Прозрачный раствор Transparent solution	4,5	Через 72 ч выпал белый осадок After 72 h, a white precipitate precipitated	Животные живы, поведение адекватное The animals are alive, behavior is adequate
3	Бесцветный раствор Colorless solution	Прозрачный раствор Transparent solution	4,9	Через 1 ч выпал белый осадок After an 1 h, a white precipitate fell out	—
4	Белая дисперсия White dispersion	Мутная дисперсия Cloudy dispersion	—	—	—
5	Бесцветный раствор Colorless solution	Прозрачный раствор Transparent solution	7,2	Через 24 ч выпал белый осадок After 24 h, a white precipitate precipitated	Животные живы, поведение адекватное The animals are alive, behavior is adequate
6	Бесцветный раствор Colorless solution	Прозрачный раствор Transparent solution	9,2	Через 2 ч помутнел After 2 h, it turned cloudy	Животные живы, поведение адекватное The animals are alive, behavior is adequate
7	Белая дисперсия White dispersion	Мутная дисперсия Cloudy dispersion	—	—	—
8	Бесцветный раствор Colorless solution	Прозрачный раствор Transparent solution	7,4	Через 24 ч выпал белый осадок After 24 h, a white precipitate precipitated	Животные живы, поведение адекватное The animals are alive, behavior is adequate
9	Белая дисперсия White dispersion	Мутная дисперсия с осадком Cloudy dispersion with sediment	—	—	—
10	Белая дисперсия White dispersion	Мутная дисперсия с осадком Cloudy dispersion with sediment	—	—	—

быть связано с неактивностью OVF-009 в кислой среде, так как при таком же пути введения этой же субстанции в 10 % ДМСО эффект на аналогичной опухолевой модели был в разы выше (неопубликованные данные).

При анализе 3 других составов оказалось, что состав №6 с щелочным pH стабилен в течение короткого периода (2 ч), в отличие от составов №5 и 8, значение pH которых было близко к нейтральному, а период стабильности составил 24 ч. Оценка проти-

воопухоловой эффективности этих составов проводится в настоящее время.

Заключение

Из предложенных составов модельных растворов для солюбилизации субстанции OVF-009 по критериям прозрачности раствора и стабильности во времени выбраны составы на основе Kolliphor® ELP №5 и 8. Состав №5 содержит дополнительно 10 % ПВП,

а в состав № 8, помимо основного солюбилизатора, добавлены 10 % этанола и 16 % ПВП. Оба состава приготовлены на фосфатном буфере и имеют нейтральный pH. Выбранные составы переданы для проведения биологических экспериментов, а период их стабильности в дальнейшем планируется удлинять

с применением метода лиофилизации. Предложенный технологический подход перспективен с точки зрения использования для солюбилизации других новых труднорастворимых ПГХ с целью обеспечения проведения скрининга и выявления наиболее эффективных соединений *in vivo*.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Dixon S.J., Stockwell B.R. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012;49:1060–72. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042
- Tang D., Kroemer G. Ferroptosis. *Curr Biol* 2020;30(21):1292–97. DOI: 10.1016/j.cub.2020.09.068
- Zhang C., Liu X., Chen S.J.Y. et al. Ferroptosis in cancer therapy: a novel approach to reversing drug resistance. *Mol Cancer* 2022;21(1):47. DOI: 10.1186/s12943-022-01530-y
- Борисова Л.М., Голубева И.С., Киселева М.П. Молекулярные характеристики ферроптоза. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)* 2019;3:11–6. DOI: 10.34673/ismu.2020.49.16.002
Borisova L.M., Golubeva I.S., Kiseleva M.P. Molecular determinants of ferroptosis. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal (Irkutsk)* 2019;3:11–16. (In Russ.) DOI: 10.34673/ismu.2020.49.16.002
- Борисова Л.М., Осипов В.Н., Гусев Д.В. и др. Производное 3-гидроксикиназолина, аналог эрастина, индуцирует ферроптоз в метастатических клетках меланомы. *Российский биотерапевтический журнал* 2021;20(1):67–73. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-1-67-73
Borisova L.M., Osipov V.N., Gusev D.V. et al. 3-Hydroxyquinazoline derivative, an analogue of erastin, induces ferroptosis in metastatic melanoma cells. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2021;20(1): 67–73. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-1-67-73
- Борисова Л.М., Осипов В.Н., Голубева И.С. и др. Производные 3-гидроксикиназолина, аналоги эрастина, индуцируют ферроптоз в клетках карциномы молочной железы. *Успехи молекулярной онкологии* 2022;9(1):48–56. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-48-56
Borisova L.M., Osipov V.N., Golubeva I.S. et al. 3-Hydroxyquinazoline derivative, an analogue of erastin, induces ferroptosis in breast cancer cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2022;9(1):48–56 (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-48-56
- Вартанян А.А., Осипов В.Н., Хоченков Д.А. и др. Производные хиринола, индуцирующие ферроптоз в метастатических клетках меланомы и рака толстой кишки. Патент Рос. Федерация № 2722308 С1 от 28.05.2020. Vartanyan A.A., Osipov V.N., Khochenkov D.A. et al. Quinazoline derivatives inducing ferroptosis in metastatic melanoma cells and colon cancer. RU 2722308C1 from 28.05.2020. (In Russ.)
- Viswanathan V.S., Ryan M.J., Dhruv H.D. et al. Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway. *Nature* 2017;547(7664):453–7. DOI: 10.1038/nature23007
- Cao J., Chen X., Jiang L. et al. DJ-1 suppresses ferroptosis through preserving the activity of S-adenosyl homocysteine hydrolase. *Nat Commun* 2020;11(1):1251. DOI: 10.1038/s41467-020-15109-y
- Oborotova N.A., Sanarova E.V. Role of new pharmaceutical technologies in enhancing the selectivity of antitumor drugs. *Zhurnal obshchei khimii = Russian Journal of General Chemistry* 2013;83(12):2541–7. DOI: 10.1134/S1070363213120529
- Гулякин И.Д., Николаева Л.Л., Оборотова Н.А. и др. Основные методы повышения растворимости гидрофобных и труднорастворимых веществ. Разработка и регистрация лекарственных средств 2016;2(15):52–9. Gulyakin I.D., Nikolaeva L.L., Oborotova N.A. et al. Common methods increasing the solubility of poorly soluble hydrophobic substances. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennikh sredstv = Drug Development and Registration* 2016;2(15):52–9. (In Russ.)
- Plotnikova E.A., Stramova V.O., Morozova N.B. et al. Solubilization of hydrophobic bacteriochlorin-based photosensitizers in micelles of surfactants. *Biomedical Photonics* 2019;8(1):18–23. DOI: 10.24931/2413-9432-2019-8-1-18-23
- Liu L., Liang Z., Zhou Y. et al. Effect of amphotericin B on the thermodynamic stability, aggregation state, hemolysis and antifungal activity of amphotericin B-nonionic surfactant micellar system. *J Mol Liq* 2023;376(4):121486. DOI: 10.1016/j.molliq.2023.121486
- Кречетов С.П., Масленикова М.С., Соловьева Н.Л., Краснюк И.И. Обоснование оптимального состава композиций ресвератрола с солюбилизаторами. *Российский биотерапевтический журнал* 2021;20(3):57–65. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-57-65
Krechetov S.P., Maslennikova M.S., Solovieva N.L., Krasnyuk I.I. Development of optimal composition formulation of resveratrol and solubilizers. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2021;20(3):57–65. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-57-65
- Sanarova E.V., Lantsova A.V., Nikolaeva L.L. et al. Using polysorbates to create parenteral dosage forms of hydrophobic substances (A review). *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal* 2022;56(7):974–8. DOI: 10.1007/s11094-022-02735-7
- Ланцова А.В., Санарова Е.В., Оборотова Н.А. и др. Разработка технологии получения инъекционной лекарственной формы на основе отечественной субстанции производной индолокарбазола – ЛХС-1208. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(3):25–32. Lantsova A.V., Sanarova E.V., Oborotova N.A. et al. Development of technology for injectable dosage form based on the national substance from the class of indolocarbazoles – LHS-1208. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2014;13(3):25–32. (In Russ.)
- Санарова Е.В., Полозкова А.П., Меерович И.Г. и др. Количественное определение тиосенса в новой липосомальной лекарственной форме. *Химико-фармацевтический журнал* 2012;46(6):54–6. Sanarova E.V., Polozkova A.P., Meerovich I.G. et al. Structure of chemical compounds, methods of analysis and process control: quantitative determination of thiosens in a new liposomal drug form. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal* 2012;46(6):54–6.
- Reinjes T. Solubility enhancement with BASF pharma polymers (Solubilizer Compendium). BASF, 2011; 128 p.
- Szymczyk K., Szaniawska M., Krawczyk J. Temperature effect on the adsorption and volumetric properties of aqueous solutions of Kolliphor® ELP. *Molecules* 2020;25:743. DOI: 10.3390/molecules25030743

Вклад авторов

Е.В. Санарова: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста статьи;

А.В. Ланцова, Л.Л. Николаева: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, редактирование статьи;

В.Н. Осипов, Д.В. Гусев: получение данных для анализа, редактирование статьи;

Л.М. Борисова: разработка дизайна исследования, редактирование статьи.

Author's contributions

E.V. Sanarova: research design development, review of publications on the topic of the article, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, article writing;

A.V. Lantsova, L.L. Nikolaeva: research design development, review of publications on the topic of the article, analysis of the obtained data, article editing;

V.N. Osipov, D.V. Gusev: obtaining data for analysis, article editing;

L.M. Borisova: research design development, article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.В. Санарова / E.V. Sanarova: <https://orcid.org/0000-0002-5592-5137>

А.В. Ланцова / A.V. Lantsova: <https://orcid.org/0000-0002-0650-2023>

Л.Л. Николаева / L.L. Nikolaeva: <https://orcid.org/0000-0001-8003-8241>

В.Н. Осипов / V.N. Osipov: <https://orcid.org/0000-0001-7726-4467>

Д.В. Гусев / D.V. Gusev: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8265>

Л.М. Борисова / L.M. Borisova: <https://orcid.org/0000-0003-4613-4584>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено в рамках государственного задания по теме «Экспериментальная разработка новых лекарственных средств для терапии злокачественных опухолей» (№ 123022100036-8).

Funding. The study was performed in the framework research work “Experimental development of new drugs for the therapy of malignant tumors” (No 123022100036-8).

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 principles of bioethics. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 07.08.2023. Принята в печать: 13.10.2023.

Article received: 07.08.2023. Accepted for publication: 13.10.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-68-75>

Моделирование высвобождения винпоцетина из микрокапсул на основе альгината натрия и хитозана методом молекулярной динамики

Ю.А. Полковникова

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»; Россия, 394018 Воронеж, Университетская пл., 1

Контакты: Юлия Александровна Полковникова juli-polk@mail.ru

Введение. При разработке состава лекарственных препаратов актуальным направлением является применение методов компьютерного моделирования, в том числе методов молекулярной динамики (МД), которая значительно расширила возможности химии, обеспечив пространственное и временное разрешение, недоступное в экспериментах.

Цель исследования – моделирование высвобождения винпоцетина из альгината натрия с оболочкой из хитозана в среды растворения методом МД для определения характеристик компьютерного моделирования, позволяющих получать микрокапсулы с заданными биофармацевтическими свойствами.

Материалы и методы. Для моделирования высвобождения винпоцетина из альгината натрия с оболочкой из хитозана использован метод МД в силовом поле GROMOS 54a7 с использованием программы Gromacs 2019. С помощью программы HyperChem 8.0.1 построены молекулы компонентов моделируемых систем. Параметризация моделей производилась посредством интернет-сервиса Automated Topology Builder (<http://atb.uq.edu.au/>).

Результаты. По результатам моделирования МД рассчитаны энергии ван-дер-ваальсова взаимодействия винпоцетина с альгинатом натрия (альгиновой кислотой), хитозаном (хитозаном-катионом) и растворителем в пересчете на 1 молекулу винпоцетина. Рассчитывались также доли молекул винпоцетина, не связанных с полимером. Определено, что средние значения энергии ван-дер-ваальсова взаимодействия между винпоцетином и растворителем в кислой среде меньше, чем в нейтральной среде. В кислой среде, в отличие от нейтральной, наблюдается незначительное высвобождение винпоцетина.

Заключение. В ходе проведенного эксперимента установлено, что при pH 2,0 наблюдается растворение хитозана в водной среде и незначительное высвобождение винпоцетина из альгиновой кислоты в водный раствор хитозана (средняя доля молекул винпоцетина, не связанных с альгинатом натрия (альгиновой кислотой) и хитозаном, составляет $2,16 \pm 2,33$ %), высвобождение винпоцетина в воду при pH 6,8 не наблюдается.

Ключевые слова: молекулярная динамика, микрокапсулы, альгинат натрия, хитозан, винпоцетин, энергии ван-дер-ваальсова взаимодействия

Для цитирования: Полковникова Ю.А. Моделирование высвобождения винпоцетина из микрокапсул на основе альгината натрия и хитозана методом молекулярной динамики. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(4):68–75. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-68-75>

Modeling the release of vinpocetine from microcapsules based on sodium alginate and chitosan by molecular dynamics

Yulia A. Polkovnikova

Voronezh State University; 1 Universitetskaya pl., Voronezh 394018, Russia

Contacts: Yulia Alexandrovna Polkovnikova juli-polk@mail.ru

Introduction. When developing the composition of drugs, an actual direction is the use of computer modeling methods, including the methods of molecular dynamics (MD), which significantly expanded the possibilities of chemistry, providing spatial and temporal resolution that is inaccessible in experiments.

Aim. To simulation of the release of vinpocetine from sodium alginate with a shell of chitosan into solvent media by the method of MD to determine the characteristics of computer simulation, which makes it possible to obtain microcapsules with desired biopharmaceutical properties.

Materials and methods. To simulate the release of vinpocetine from sodium alginate with a shell of chitosan, the MD method in the GROMOS 54a7 force field was used using the Gromacs 2019 program. Using the HyperChem 8.0.1 program, the molecules of the components of the simulated systems were constructed. The models were parameterized using the Internet service Automated Topology Builder (<http://atb.uq.edu.au/>).

Results. Based on the results of MD modeling, the van der Waals interaction energies of vinpocetine with sodium alginate (alginic acid), with chitosan (chitosan-cation) and with a solvent in terms of 1 molecule of vinpocetine were calculated. The fractions of vinpocetine molecules not bound to the polymer were also calculated. It has been established that the average values of the energy of the van der Waals interaction between vinpocetine and the solvent in an acidic medium are lower than in a neutral medium. Also, in an acidic environment, in contrast to a neutral environment, a slight release of vinpocetine is observed.

Conclusion. In the course of the experiment, it was found that at pH 2.0, chitosan dissolves in an aqueous medium and a slight release of vinpocetine from alginic acid into an aqueous solution of chitosan is observed (the average proportion of vinpocetine molecules not associated with sodium alginate (alginic acid) and chitosan is 2.16 ± 2.33 %), the release of vinpocetine into water at pH 6.8 is not observed.

Keywords: molecular dynamics, microcapsules, sodium alginate, chitosan, vinpocetine, van der Waals interaction energies

For citation: Polkovnikova Yu.A. Modeling the release of vinpocetine from microcapsules based on sodium alginate and chitosan by molecular dynamics. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2023;22(4):68–75. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-68-75>

Введение

В современной фармации при разработке лекарственных средств (ЛС) все большее значение придается применению комплексов с хитином и хитозаном, а также использованию в качестве оболочки альгината натрия [1, 2]. Данные полимеры обладают следующими преимуществами: они широко распространены, просты в производстве, биоразлагаемы и биосовместимы [3]. Хитозан и альгинат продемонстрировали адгезию к слизистой оболочке, биоразлагаемость и биосовместимость [4]. Нано- и микрочастицы хитозана/альгината, приготовленные методом ионного геля с использованием хитозана и альгината в качестве оболочек, привлекли внимание в качестве пероральных носителей ЛС [5]. Нано- и микрочастицы хитозана/альгината проявляли сильные электростатические взаимодействия между карбоксильными группами альгината и аминогруппами хитозана, что приводило к усадке и образованию геля при низком pH, тем самым защищая ЛС от агрессивной среды желудочно-кишечного тракта [6]. Кроме того, пероральные нано- и микрочастицы хитозана/альгината, используемые для доставки ЛС в толстую кишку, имеют определенные преимущества, включая повышенную абсорбцию лекарств, улучшенную биодоступность пероральных ЛС и терапевтическую эффективность, снижение системной токсичности и снижение вводимой дозы. Эти свойства позволяют считать указанные частицы новыми пероральными системами доставки, в том числе и микрокапсулированными [7].

Актуальным направлением фармацевтической технологии становится инкапсулирование лекарственных веществ ноотропного действия. Перспективным лекарственным веществом ноотропного действия для создания микрокапсулированной фор-

мы является винпоцетин, который в настоящее время выпускается в таблетированной форме и форме раствора для инъекций [8].

Одна из стратегий разработки систем доставки ЛС с целью усовершенствования специфичной для каждого заболевания направленности действия ЛС — контроль за скоростью высвобождения действующего вещества. Моделирование межмолекулярного взаимодействия в лекарственных формах позволяет с высокой точностью определять свойства молекулярных систем, экспериментальное определение которых затруднительно и аналогичной точности достигнуть не позволяет. Сегодня применение моделирования молекулярной динамики (МД) привело к большим достижениям во многих научных дисциплинах, таких как химическая физика, материаловедение и биофизика. Эта вычислительная методология продемонстрировала высокую актуальность для детальной характеристики биомолекулярных систем, включая взаимодополняемость с экспериментальными данными, оптимизацию дизайна эксперимента и прогнозирование соответствующих свойств химических систем. Данный метод компьютерного моделирования (КМ) используется на начальных этапах проектирования и разработки ЛС [9, 10].

Цель исследования — моделирование высвобождения винпоцетина из альгината натрия с оболочкой из хитозана в среды растворения методом МД для определения характеристик КМ, позволяющих получать микрокапсулы с заданными биофармацевтическими свойствами.

Материалы и методы

С использованием программы Gromacs 2019 в силовом поле GROMOS 54a7 методом МД проведено

моделирование высвобождения винпоцетина из альгината натрия и хитозана [11–13]. Модели молекул компонентов моделируемых систем построены с помощью программы NuserChem 8.0.1 [14]. Параметризация моделей производилась посредством интернет-сервиса Automated Topology Builder (<http://atb.uq.edu.au/>) [15]. Для построения моделей полимеров параметризация производилась для фрагментов полимерной цепи из 3 мономеров. Результаты параметризации далее использованы для построения моделей молекул полимеров с помощью программы Assemble! [16].

Сборка моделируемых систем производилась с использованием программы Gromacs 2019. В состав моделируемой системы включены молекулы винпоцетина, альгината натрия длиной 240 мономеров с молярной массой 42,0 кДа (без учета массы ионов натрия), молекулы альгиновой кислоты длиной 240 мономеров с молярной массой 42,3 кДа, молекулы хитозана длиной 240 мономеров с молярной массой 38,7 кДа, молекулы хитозана-катиона длиной 240 мономеров с молярной массой 38,9 кДа. Для изучения высвобождения винпоцетина из микрокапсул построены модели сплавов винпоцетина с альгинатом натрия и альгиновой кислотой [13]. Подготовка моделей сплавов производилась путем моделирования МД смесей винпоцетина с полимерами. Затем для смесей винпоцетина с полимерами производилось моделирование МД с использованием термостатирования (термостат Берендсена, 700 К) и баростатирования (баростат Берендсена, 1 атм) [13, 17] с шагом 1 фс в течение 20 нс.

Далее в модель альгината натрия с винпоцетином встраивалась макромолекула хитозана, а в модель альгиновой кислоты с винпоцетином-катионом — молекула хитозана-катиона. После этого производилась оптимизация геометрии собранных систем градиентным методом и моделирование МД с целью термодинамического уравнивания (шаг интегрирования 1 фс, температура 310 К, изотропный баростат Берендсена, давление 1 атм, длительность 20 нс) [13, 17, 18].

После термодинамического уравнивания полученных систем к ним добавлялись среды растворения и ионы Na^+ и Cl^- для уравнивания суммарного электрического заряда. В результате получены системы для изучения высвобождения винпоцетина:

- 1) вода для альгината натрия с хитозаном;
- 2) вода для альгиновой кислоты с хитозаном-катионом.

Моделирование МД проводили в течение 100 нс (термостат Нозе–Гувера 310 К [13, 19], константа 0,5 фс, изотропный баростат Парринелло–Рамана 1 атм с константой 5 фс и шагом интегрирования 0,5 фс). В процессе моделирования использованы

периодические граничные условия по всем осям координат.

По результатам моделирования МД рассчитывались энергии ван-дер-ваальсова взаимодействия (ЭВДВВ) винпоцетина с альгинатом натрия (альгиновой кислотой), хитозаном (хитозаном-катионом) и растворителем в пересчете на 1 молекулу винпоцетина, доли молекул винпоцетина, не связанных с полимерами [13, 20]. В качестве критерия потери связи с полимером использовалось межатомное расстояние с порогом 0,5 нм для всех атомов винпоцетина и полимера.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены молекулярные составы моделируемых систем.

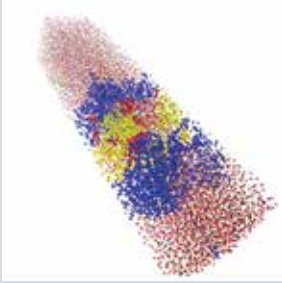
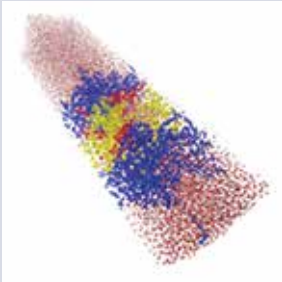
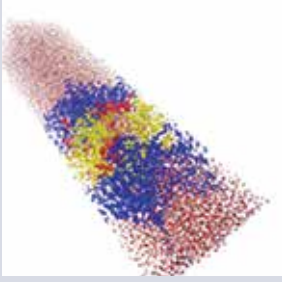
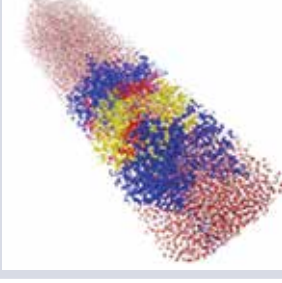
Таблица 1. Количество молекул компонентов моделируемых систем
Table 1. The number of molecules of the components of the simulated systems

Вещество Substance	Альгинат натрия–хитозан–вода Sodium alginate–chitosan–water	Альгиновая кислота–хитозан–катион–вода Alginic acid–chitosan cation–water
Винпоцетин Vinpocetine	30	–
Винпоцетин-катион Vinpocetine cation	–	30
Cl^-	–	510
Na^+	240	–
Альгинат Alginate	1	–
Альгиновая кислота Alginic acid	–	1
Хитозан Chitosan	2	–
Хитозан-катион Chitosan-cation	–	2
Вода Water	9626	8110

При моделировании высвобождения винпоцетина из альгината натрия через хитозан в водную среду наблюдалось набухание полимеров. При этом не наблюдалось высвобождения винпоцетина из альгината натрия (табл. 2) и прохождения его молекул через слой хитозана.

Таблица 2. Моделирование МД высвобождения винпоцетина из системы «альгинат натрия–хитозан» в воду

Table 2. Modeling of the molecular dynamics (MD) of the release of vinpocetine from the system “sodium alginate–chitosan” into water

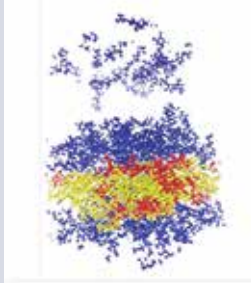
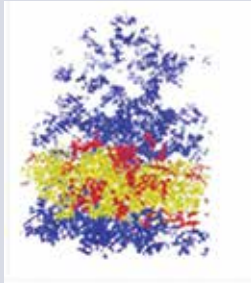
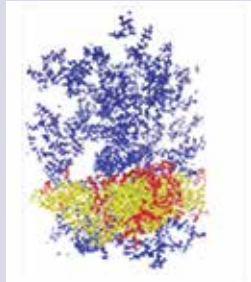
Время, нс Time, ns	Изображение системы System Image
0	
40	
80	
100	

На графике (рис. 1) отмечено, что ЭВДВВ винпоцетина с альгинатом натрия остается на уровне 200 кДж/моль в пересчете на 1 молекулу винпоцетина в течение 100 нс.

Расчет степени высвобождения винпоцетина в водную среду из полимеров показывает нулевую степень высвобождения в течение 100 нс (рис. 2).

Таблица 3. Моделирование МД высвобождения винпоцетина-катиона из системы «альгиновая кислота–хитозан–катион» в воду на этапе термодинамического уравнивания

Table 3. Modeling of the MD of the release of vinpocetine-cation from the “alginic acid–chitosan–cation” system into water at the stage of thermodynamic balancing

Время, нс Time, ns	Моделирование МД Modeling of the MD
5	
25	
35	

При моделировании высвобождения винпоцетина из альгиновой кислоты через хитозан-катион в водную среду (рН 2,0) наблюдается растворение хитозана в воде. При этом наблюдается небольшое высвобождение винпоцетина в водную среду (табл. 3, 4).

После 60 нс отмечено уменьшение по модулю ЭВДВВ винпоцетина с альгиновой кислотой, что соответствует небольшому высвобождению молекул винпоцетина в воду (рис. 3).

В кислой среде наблюдается небольшая — до 7 % — доля молекул винпоцетина, высвободившихся в воду (рис. 4).

В табл. 5 представлены средние значения ЭВДВВ винпоцетина с компонентами микрокапсулы и растворителем, а также средняя доля молекул винпоцетина, не связанных с носителем.

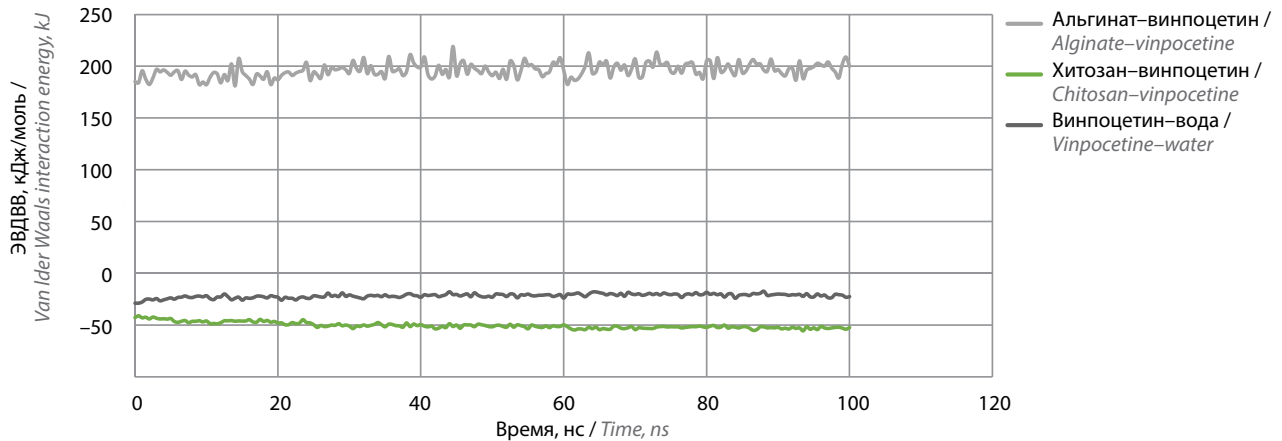


Рис. 1. ЭВДВВ винпоцетина с альгинатом натрия, хитозаном и со средой растворения (рН 7,0) в пересчете на 1 молекулу винпоцетина

Fig. 1. Van der Waals interaction energy of vinpocetine with sodium alginate, with chitosan and with a dissolution medium (pH 7.0) in terms of one molecule of vinpocetine

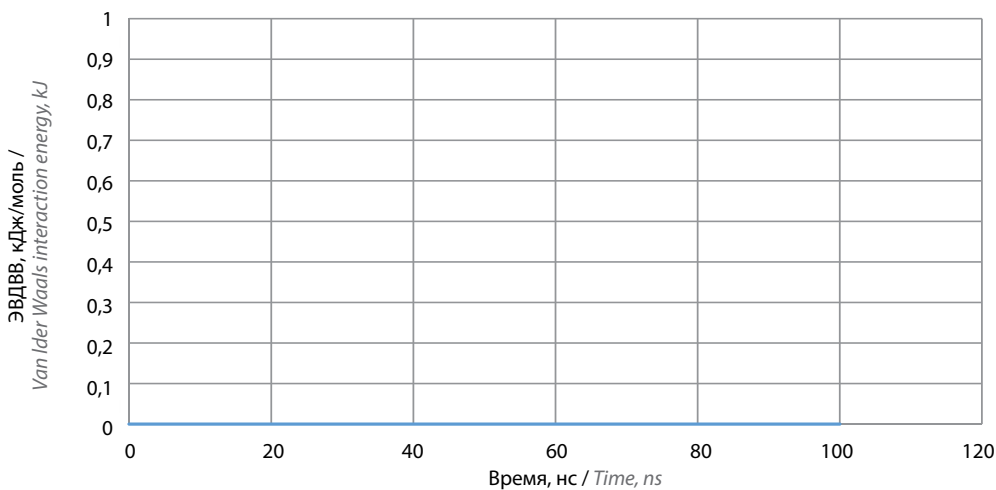


Рис. 2. Оценка доли молекул винпоцетина, не связанных с альгинатом натрия и хитозаном, в воде

Fig. 2. Estimation of the proportion of vinpocetine molecules not associated with sodium alginate and chitosan in water

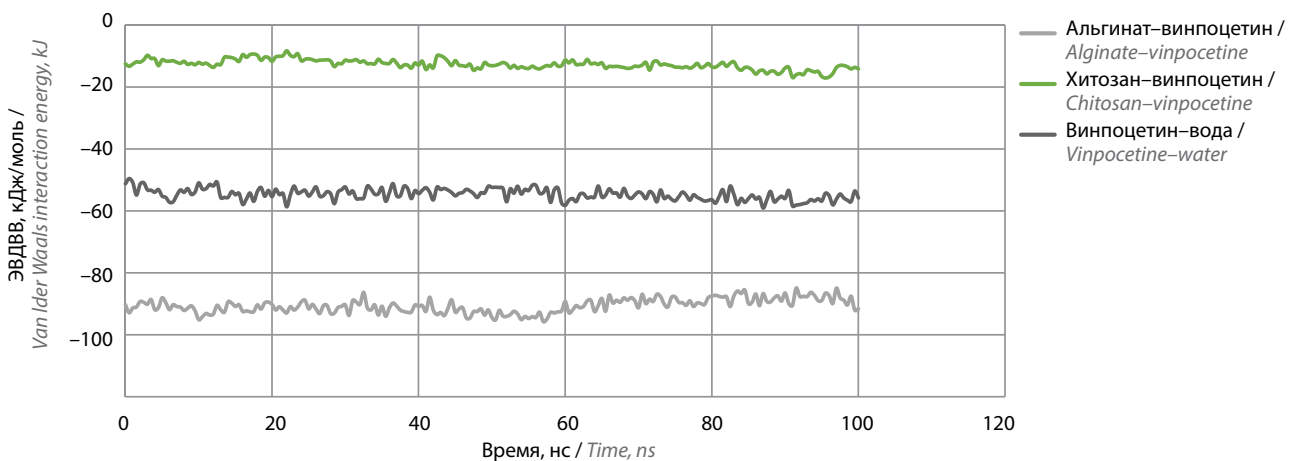
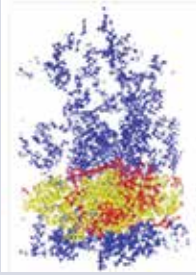
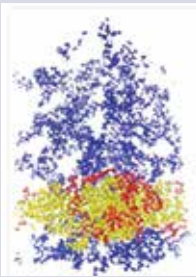


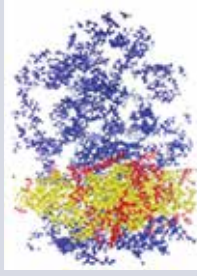
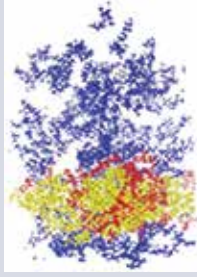
Рис. 3. ЭВДВВ винпоцетина с альгиновой кислотой, хитозаном и со средой растворения (рН 2,0) в пересчете на одну молекулу винпоцетина

Fig. 3. Van der Waals interaction energy of vinpocetine with alginic acid, chitosan and solvent (water at pH 2.0) in terms of one molecule of vinpocetine

Таблица 4. Моделирование МД высвобождения винпоцетина-катиона из системы «альгиновая кислота–хитозан–катион» в воду на основном этапе

Table 4. Modeling of the MD of the release of vinpocetine-cation from the “alginate acid–chitosan–cation” system into water at the main stage

Время, нс Time, ns	Моделирование МД Modeling of the MD
0	
40	

Время, нс Time, ns	Моделирование МД Modeling of the MD
80	
100	

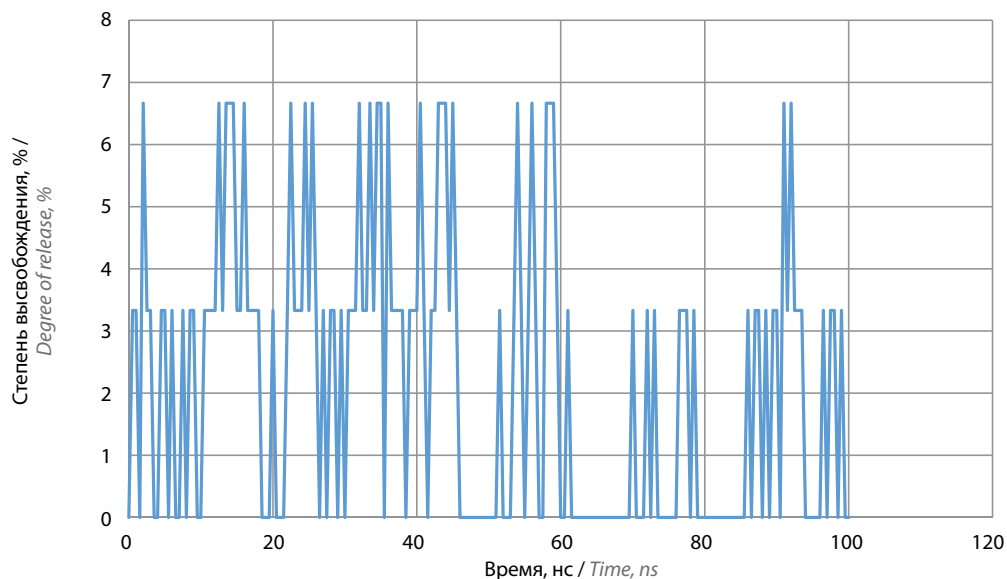


Рис. 4. Оценка доли молекул винпоцетина, не связанных с альгиновой кислотой и хитозаном, в среде растворения при pH 2,0
Fig. 4. Estimation of the proportion of vinpocetine, not associated with alginate acid and chitosan in a dissolution medium at pH 2.0

Установлено, что средние значения ЭВДВВ между винпоцетином и растворителем в кислой среде меньше, чем в нейтральной среде, также в кислой среде, в отличие от нейтральной, наблюдается незначительное высвобождение винпоцетина.

Высвобождение винпоцетина в воду при pH 6,8 в вычислительном эксперименте не наблюдается. Растворение альгината натрия и хитозана в воде при pH 6,8 в проведенном вычислительном эксперименте не наблюдается. При pH 2,0 наблюдается растворение хитозана в водной среде и незначительное

Таблица 5. Средние значения параметров высвобождения винпоцетина из исследуемых комплексов с полимерами

Table 5. Average values of vinpocetine release parameters from the studied complexes with polymers

Система System	Средняя ЭВДВ винпоцетина с альгинатом натрия (альгиновой кислотой), кДж/моль Average energy of van der Waals interaction of vinpocetine with sodium alginate (alginic acid), kJ/mol	Средняя ЭВДВ винпоцетина с хитозаном, кДж/моль Average energy of van der Waals interaction of vinpocetine with chitosan, kJ/mol	Средняя ЭВДВ винпоцетина с растворителем, кДж/моль Average energy of van der Waals interaction of vinpocetine with solvent, kJ/mol	Средняя доля молекул винпоцетина, не связанных с альгинатом натрия (альгиновой кислотой) и хитозаном, % Average proportion of vinpocetine molecules not bound to sodium alginate (alginic acid) and chitosan, %
Альгинат натрия–хитозан–винпоцетин–вода (pH 6,8) Sodium alginate–chitosan–vinpocetine–water (pH 6,8)	195,92 ± 6,91	–50,27 ± 2,97	–21,69 ± 1,95	0,00 ± 0,00
Альгиновая кислота–хитозан–катион–винпоцетин–катион–вода (pH 2,0) Alginic acid–chitosan cation–vinpocetine cation–water (pH 2,0)	–90,62 ± 2,28	–12,75 ± 1,55	–54,63 ± 1,83	2,16 ± 2,33

Таблица 6. Соответствие результатов компьютерного моделирования и исследований биофармацевтических характеристик микрокапсул винпоцетина

Table 6. Correspondence between the results of computer modeling and studies of biopharmaceutical characteristics of vinpocetine microcapsules

Форма лекарственного средства Form of the medicinal product	Результаты моделирования Simulation results	Биофармацевтические характеристики Biopharmaceutical characteristics
Микрокапсулы Microcapsules	Средняя доля молекул винпоцетина, не связанных с альгинатом натрия (альгиновой кислотой) и хитозаном: от 0 до 5 % Average proportion of vinpocetine molecules not associated with sodium alginate (alginic acid) and chitosan: from 0 to 5 %	За 3 ч количество высвободившегося лекарственного средства – не менее 75 % Within 3 hours, the amount of drug released is at least 75 %

высвобождение винпоцетина из альгиновой кислоты в водный раствор хитозана.

В результате исследований нами проведена оценка соответствия теоретических и экспериментальных исследований микрокапсулированных форм винпоцетина [2]. Установлены значения характеристик результатов КМ, позволяющие получать микрокапсулы с заданными биофармацевтическими характеристиками (табл. 6).

Заключение

Установлены значения характеристик результатов КМ, позволяющие получать микрокапсулы

с заданными биофармацевтическими характеристиками: средняя доля молекул винпоцетина, не связанных с альгинатом натрия (альгиновой кислотой) и хитозаном, составляет от 0 до 5 %: за 3 ч количество высвободившегося ЛС – не менее 75 %. В результате исследований получены пролонгированные микрокапсулированные формы винпоцетина, представляющие собой формы дозирования с модифицированным высвобождением, проявляющие длительное высвобождение по сравнению с формой дозирования винпоцетина с немедленным высвобождением.

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

1. Nagras N.A., Mogahed N., Sheta E. et al. The powerful synergistic effect of spiramycin/propolis loaded chitosan/alginate nanoparticles on acute murine toxoplasmosis. *PLOS Negl Trop Dis* 2022;16;16(3):e0010268. DOI: 10.1371/journal.pntd.0010268
2. Полковникова Ю.А., Северинова Н.А., Корянова К.Н. и др. Морфологические, технологические и биофармацевтические исследования альгинат-хитозановых микрокапсул с винпоцетином. *Фармация и фармакология*. 2019;7(5): 279–90. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-279-290
Polkovnikova Yu.A., Severinova N.A., Koryanova K.N. et al. Morphological, technological and biopharmaceutical studies of alginate-chitosan microcapsules with vinpocetine. *Farmaciya i farmakologiya = Pharmacy and Pharmacology* 2019;7(5): 279–90. (In Russ.). DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-279-290
3. Manivasagan P., Bharathiraja S., Bui N.Q. et al. Doxorubicin-loaded fucoidan capped gold nanoparticles for drug delivery and photoacoustic imaging. *Int J Biol Macromol* 2016;91: 578–88. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.06.007
4. Chu J.S., Wang Z.J. Protocol optimization for renal mass detection and characterization. *Radiol Clin North Am* 2020;58:851–73. DOI: 10.1016/j.rcl.2020.05.003
5. Li J., Wu H., Jiang K. et al. Alginate calcium microbeads containing chitosan nanoparticles for controlled insulin release. *Appl Biochem Biotechnol* 2021;193:463–78. DOI: 10.1007/s12010-020-03420-9
6. Sudhakar S., Chandran S.V., Selvamurugan N., Nazeer R.A. Biodistribution and pharmacokinetics of thiolated chitosan nanoparticles for oral delivery of insulin *in vivo*. *Int J Biol Macromol* 2020;150:281–8. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.079
7. Kumar P., Mishra B. Colon targeted drug delivery systems – an overview. *Curr Drug Deliv* 2008;5:186–98. DOI: 10.2174/156720108784911712
8. Полковникова Ю.А., Глушко А.А. Выбор пленкообразователей при микрокапсулировании винпоцетина. *Фармация и фармакология* 2018;6(2):197–210. DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-2-197-210
Polkovnikova Yu.A., Glushko A.A. The choice of film formers for microencapsulation of vinpocetine. *Farmaciya i farmakologiya = Pharmacy and Pharmacology* 2018;6(2):197–210. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-2-197-210
9. Sorin E.J., Pande V.S. Exploring the helix-coil transition via all-atom equilibrium ensemble simulations. *Biophys J* 2005; 88(4):2472–93. DOI: 10.1529/biophysj.104.051938
10. Parrinello M., Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J Appl Phys* 1981;52:7182–90. DOI: 10.1063/1.328693
11. Schmid N., Eichenberger A.P., Choutko A. et al. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *Eur Biophys J* 2011;40(7):843–56. DOI: 10.1007/s00249-011-0700-9
12. Abraham M.J., Murtola T., Schulz R. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 2015; 1–2:19–25. DOI: 10.1016/j.softx.2015.06.001
13. Полковникова Ю.А., Сливкин А.И. Высвобождение фенибута из альгинат-хитозановых микрокапсул. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2021;4:120–5.
Polkovnikova Yu.A., Slivkin A.I. Phenibut release from alginate-chitosan microcapsules. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya = Bulletin of the Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy* 2021;4:120–5. (In Russ.).
14. Teppen J.B. HyperChem, release 2: molecular modeling for the personal computer. *JCICS* 1992;32:757–9.
15. Malde A.K., Zuo L., Breeze M. et al. An Automated force field Topology Builder (ATB) and repository: version 1.0. *J Chem Theory Comput* 2011;7:4026–37. DOI: 10.1021/ct200196m
16. Degiacomi M.T., Erastova V., Wilson M.R. Easy creation of molecular dynamics simulations of polymeric mixtures with Assemble! *Computer Physics Communications* 2016;202:304–9. DOI: 10.1016/j.cpc.2015.12.026
17. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 1984;81(8):3684–90. DOI: 10.1063/1.448118
18. Shirts M.R., Klein C., Swails J. M. et al. Lessons learned from comparing molecular dynamics engines on the SAMPL5 dataset. *J Comput Aided Mol Des* 2017;31(1):147–61. DOI: 10.1007/s10822-016-9977-1
19. Bekker H., Dijkstra E.J., Renardus M.K.R., Berendsen H.J.C. An efficient, box shape independent non-bonded force and virial algorithm for molecular dynamics. *Mol Sim* 1995;14(3):137–52. DOI: 10.1080/08927029508022012
20. Braga C., Travis K.P. A configurational temperature Nosé–Hoover thermostat. *J Chem Phys* 2005;123(13):134101. DOI: 10.1063/1.2013227

ORCID автора / ORCID of author

Ю.А. Полковникова / Yu.A. Polkovnikova: <https://orcid.org/0000-0003-0123-9526>

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The author declare no conflict of interest.

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

Статья поступила: 26.06.2023. **Принята в печать:** 13.10.2023.
Article received: 26.06.2023. **Accepted for publication:** 13.10.2023.