

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



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossijskij bioterapevticeskij zurnal

**Russian Journal
of Biotherapy**

2

TOM/VOL. 23
2024

2024 • ТОМ 23 • № 2

Российский Биотерапевтический Журнал

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

Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal

теоретический и научно-практический рецензируемый журнал

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

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

ОСНОВАН В 2002 г. профессором А.Ю. Барышниковым

2 ^{ТОМ 23}
'24

Учредитель:

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

Адрес учредителя и редакции:
115478, Москва, Каширское
шоссе, 24, стр. 2.

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

E-mail: biotherapy_rbj@mail.ru
rbjournal@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 И.К. Пряхина
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.
2024. Том 23. № 2. 1–92.

© Оформление, верстка.

ООО «ИД «АБВ-пресс», 2024

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 фармации Института фармации им. П.А. Нелюбина 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, профессор кафедры фармации Института фармации им. П.А. Нелюбина 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 нанобиоинженерии Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ» (Москва, Россия)

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

Оборотова 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)

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

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

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

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

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

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Барышников 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)

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

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

Russian Journal of Biotherapy

Peer-reviewed theoretical and SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

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

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

FOUNDED IN 2002 by Professor A.Yu. Baryshnikov

2^{VOL. 23}
'24

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 115478.

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

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

Publishing office:

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

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

www.abvpress.ru

Editor Yu.N. Biriukova
Proofreader I.K. Pryahina
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk

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

If materials are reprinted in whole or in part, reference must necessarily be made to the "Rossijskij bioterapevticeskij zhurnal".

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

Rossijskij bioterapevticeskij zhurnal. 2024. Volume 23. No 2. 1–92.

© Design, layout PH "ABV-Press", 2024

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, Professor of Chair of Pharmacy, P.A. Nelyubin Institute of Pharmacy, 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)

Bunyatyan, Natalia D., PhD, DSc, Professor, Professor of Chair of Pharmacy, P.A. Nelyubin Institute of Pharmacy, 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. Postovsky 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 Nanobioengineering, 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 Nizhgorodsky State University, Head of Laboratory of Immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (Nizhny Novgorod, Russia)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

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

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

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

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

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)

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

- Н.В. Павлова, С.С. Дёмин, М.И. Чурносков, И.В. Пономаренко*
Роль полиморфных маркеров генов матриксных металлопротеиназ в опухолевой прогрессии рака молочной железы10
- Г.Г. Макиев, М.Ю. Федянин, Е.О. Игнатова, О.А. Кузнецова, Я.Е. Чихарева, А.А. Трякин*
Экспрессионные характеристики опухоли как прогностические и предиктивные маркеры резектабельного и местно-распространенного колоректального рака25
- С.Д. Щеглов*
Иммуноконъюгаты как препараты таргетной онкотерапии36
- В.А. Шитиков, Е.Н. Кособокова*
Перспективы анти-EVs-терапии в аспекте меланомы кожи47

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- А.А. Борунова, А.А. Алимов, И.Б. Шоуа, А.И. Черткова, З.Г. Кадагидзе, А.Ю. Кузеванова, Н.К. Жумабаев, Ф.М. Абдул, О.А. Халмурзаев, К.С. Немцева, А.В. Матвеев, П.В. Кононец, В.Б. Матвеев, Т.Н. Заботина*
Два типа иммунного микроокружения рака почки60
- О.В. Корытов, Л.И. Корытова, С.Г. Григорьев*
Исследование рисков возникновения лучевых реакций у пациентов, получающих облучение органов малого таза69
- П.В. Царапаев, М.А. Барышникова, А.В. Пономарев, А.А. Рудакова, З.А. Соколова, К.А. Барышников, Г.М. Левагина, Е.Д. Даниленко, В.С. Косоруков*
Исследование препаратов Ридостин Про и Poly(I:C) в качестве адъювантов для противоопухолевой вакцины на модели E.G7-OVA78
- В.В. Давыдова, Э.Ф. Степанова, А.М. Шевченко, А.С. Чиряпкин, А.П. Плетень, А.А. Прокопов*
Разработка технологии и исследование комбинированных таблеток с модифицированным высвобождением преднизолонa и лоратадина85

REVIEW

*Nadezhda V. Pavlova, Sergey S. Dyomin, Mikhail I. Churnosov,
Irina V. Ponomarenko*

The role of polymorphic markers of matrix metalloproteinase genes in the tumoral progression of breast cancer 10

*Georgii G. Makiev, Mikhail Yu. Fedyanin, Ekaterina O. Ignatova, Olesya A. Kuznetsova,
Yana E. Chikhareva, Alexey A. Tryakin*

Expression characteristics of tumors as prognostic and predictive markers for resectable and locally advanced colorectal cancer 25

Stepan D. Shceglov

Immunoconjugates as drugs of targeted oncotherapy 36

Vasily A. Sheetikov, Ekaterina N. Kosobokova

Prospects for anti-EVs therapy in the context of skin melanoma 47

ORIGINAL REPORTS

*Anna A. Borunova, Andrei A. Alimov, Ilona B. Showa, Antonina I. Chertkova,
Zaira G. Kadagidze, Anna Yu. Kuzevanova, Nurlan K. Zhumabaev, Farkhad M. Abdul,
Oybek A. Khalmurzaev, Karolina S. Nemtseva, Aleksey V. Matveev, Pavel V. Kononets,
Vsevolod B. Matveev, Tatiana N. Zabolotina*

The two types of immune microenvironment of renal cancer 60

Oleg V. Korytov, Luiza I. Korytova, Stepan G. Grigorjev

Study of the risks of radiation induced reactions in patients receiving irradiation of the pelvic organs 69

*Pavel V. Tsarapaev, Maria A. Baryshnikova, Aleksandr V. Ponomarev, Anna A. Rudakova,
Zinaida A. Sokolova, Kirill A. Baryshnikov, Galina M. Levagina, Elena D. Danilenko,
Vyacheslav S. Kosorukov*

Study of Ridostin Pro and Poly(I:C) as adjuvants for cancer vaccine on the E.G7-OVA model 78

*Victoria V. Davydova, Eleonora F. Stepanova, Alexander M. Shevchenko,
Aleksey S. Chiriapkin, Anatoliy S. Pleten, Aleksey A. Prokopov*

Development of technology and study of combination tablets of prednisolone and loratadine with modified release 85

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-10-24>

Роль полиморфных маркеров генов матричных металлопротеиназ в опухолевой прогрессии рака молочной железы

Н.В. Павлова^{1,2}, С.С. Дёмин^{1,2}, М.И. Чурносков², И.В. Пономаренко²

¹ОГБУЗ «Белгородский областной онкологический диспансер»; Россия, 308010 Белгород, ул. Куйбышева, 1;

²ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Минобрнауки России; Россия, 308015 Белгород, ул. Победы, 85

Контакты: Сергей Сергеевич Дёмин doctor.dyomin@gmail.com

Цель исследования – обобщение актуальных представлений о патогенетике рака молочной железы (РМЖ) с позиций вовлеченности генов – кандидатов матричных металлопротеиназ (MMPs) и их клинико-патологического значения.

Материалы и методы. Поиск источников по теме работы осуществляли в системах PubMed, Medline, Cochrane Library, eLibrary, NHGRI-EBI Catalog of GWAS. За период с января 2004 г. по декабрь 2022 г. найдено 158 публикаций, посвященных изучению роли MMPs в развитии РМЖ. Поисковые запросы включали данные об ассоциациях различных локусов MMPs с формированием и течением РМЖ. В настоящий обзор включены 60 работ из общей выборки. Критериями включения источников являлись данные полногеномных ассоциативных исследований (GWAS), ассоциативных исследований, выполненных на репрезентативных выборках больных, с необходимой мощностью исследования. Включали данные, характеризующие клинико-патологическое значение (связь с молекулярным подтипом РМЖ, выживаемостью и прогнозом заболевания, риском метастазирования и степенью злокачественности) полиморфных маркеров MMPs. Исключены данные ассоциативных исследований генов MMPs с развитием злокачественных новообразований молочной железы, морфологически не являющихся карциномами, выполненные на малочисленных (не репрезентативных) выборках групп больных и контроля.

Результаты. Клиническая картина РМЖ, особенности лечения, а также выживаемость больных зависят от взаимодействия разнообразных факторов риска, в том числе и генетических. Связь полиморфизмов генов MMPs с РМЖ активно изучается. Наиболее хорошо изученными являются полиморфизмы генов MMP1 (rs1799750), MMP2 (rs243865), MMP9 (rs3918242, rs17576, rs2250889, rs3787268), для которых продемонстрирована связь с развитием РМЖ, метастазированием и выживаемостью. В значительной степени однозначные данные литературы о связи с РМЖ (риском развития заболевания, степенью злокачественности карцином, регионарным и отдаленным метастазированием, снижением выживаемости больных) представлены для полиморфных вариантов 2G rs1799750 MMP1, T rs3918242 MMP9, G rs17576 MMP9, G rs2250889 MMP9 (факторы риска) и T rs243865 MMP2 (протективный фактор). Наряду с этим по большинству других полиморфизмов MMPs (rs3787268 MMP9, rs1940475 MMP8 и др.) данные малочисленны, а также нередко не согласуются между собой.

Заключение. Продолжение исследований по изучению связи полиморфизма генов MMPs с РМЖ с целью расширения экспериментальных данных по этому вопросу является важной научно-практической задачей и позволит выработать «однозначные» представления об их влиянии на течение и прогноз заболевания.

Ключевые слова: рак молочной железы, матричные металлопротеиназы, полиморфизм, ассоциации

Для цитирования: Павлова Н.В., Дёмин С.С., Чурносков М.И., Пономаренко И.В. Роль полиморфных маркеров генов матричных металлопротеиназ в опухолевой прогрессии рака молочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(2):10–24.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-10-24>

The role of polymorphic markers of matrix metalloproteinase genes in the tumoral progression of breast cancer

Nadezhda V. Pavlova^{1,2}, Sergey S. Dyomin^{1,2}, Mikhail I. Churnosov², Irina V. Ponomarenko²

¹Belgorod Regional Oncology Dispensary; 1 Kuybysheva St., Belgorod 308010, Russia;

²Belgorod State National Research University, Russian Ministry of Education and Science; 85 Pobedy St., Belgorod 308015, Russia

Contacts: Sergey Sergeevich Dyomin doctor.dyomin@gmail.com

Aim. Summarizing current insights into the pathogenesis of breast cancer (BC) from the perspective of candidate gene involvement, specifically matrix metalloproteinase genes (*MMPs*), and their clinicopathological significance.

Materials and methods. Source retrieval for the study was conducted using PubMed, Medline, Cochrane Library, eLibrary, NHGRI-EBI Catalog of GWAS databases. Publications from January 2004 to December 2022 were included. A total of 158 sources related to the role of *MMPs* in BC development were identified. Search queries encompassed associations of different *MMPs* loci with BC formation and progression. This review included 60 selected works, adhering to inclusion criteria based on comprehensive genome-wide association studies (GWAS) and representative patient cohort association studies with adequate statistical power. Data encompassing clinicopathological significance (association with BC molecular subtype, survival, disease prognosis, metastasis risk, and malignancy grade) of *MMPs* polymorphic markers were incorporated. Excluded were data from *MMPs* gene association studies with non-carcinoma breast diseases and studies conducted on small, non-representative patient and control samples.

Results. The clinical presentation of BC, treatment nuances, and patient survival depend on the interaction of various risk factors, including genetic ones. The association between *MMPs* gene polymorphisms and BC is actively investigated. Well-studied polymorphisms include *MMP1* (rs1799750), *MMP2* (rs243865), and *MMP9* (rs3918242, rs17576, rs2250889, rs3787268), which have shown correlations with BC development, metastasis, and survival. Literature data significantly support the association with BC – risk susceptibility, malignancy grade, regional and distant metastasis, and patient survival – for polymorphic variants 2G rs1799750 *MMP1*, T rs3918242 *MMP9*, G rs17576 *MMP9*, G rs2250889 *MMP9* (risk factors), and T rs243865 *MMP2* (protective factor). In contrast, data on most other *MMP* polymorphisms (rs3787268 *MMP9*, rs1940475 *MMP8*, etc.) are limited and often discordant.

Conclusion. Continuing research into the association between *MMPs* gene polymorphisms and BC is an important scientific and practical task, aiming to expand empirical knowledge in this domain and ultimately establish definitive insights into their influence on disease progression and prognosis.

Keywords: breast cancer, matrix metalloproteinases, polymorphism, associations

For citation: Pavlova N.V., Dyomin S.S., Churnosov M.I., Ponomarenko I.V. The role of polymorphic markers of matrix metalloproteinase genes in the tumoral progression of breast cancer. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(2):10–24. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-10-24>

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) — злокачественная опухоль, клетки которой формируются из долек и протоков тканей молочных желез [1]. По данным GLOBOCAN, мировая заболеваемость РМЖ составляет более 2 млн случаев в год [2]. Вместе с тем общее число случаев регистрации злокачественных новообразований в мире составляет более 19,3 млн, при этом 11,7 % среди них — это заболеваемость РМЖ (наиболее частая локализация) [2]. У женщин доля РМЖ среди всех злокачественных новообразований (ЗНО) любых локализаций продолжает оставаться высокой и составляет 24,5 % [3], что свидетельствует о важном медико-социальном значении данного заболевания [4]. По данным официальной статистики Российской Федерации за 2020 г., женщин с впервые выявленным РМЖ было 65,0 тыс. человек, а заболеваемость была равна 82,8:100 000 населения [5]. Рост заболеваемости карциномами молочной железы в России неуклонно возрастает: стандартизованный показатель за последние 10 лет увеличился с 46,17 (в 2012 г.) до 54,04:100 000 населения (в 2022 г.), среднегодовой прирост заболеваемости зарегистрирован 1,51 % [6].

Считается, что генетические факторы значимы для формирования РМЖ [7]. При этом наследуемость РМЖ достигает 31 %, а вклад средового компонента — 16 % [8, 9].

Современные данные литературы указывают на большое значение в патогенетике РМЖ генов матриксных металлопротеиназ (*MMPs*) как «потенциальных» генов — кандидатов РМЖ [10, 11]. Влияние одноименных протеинов, экспрессируемых этими генами, на формирование и течение РМЖ в настоящее время бесспорно [12–14]. Являясь коллагеназами, вызывающими лизис проапоптотических факторов, модулирующими синтез фибробластов и эндотелиоцитов, а также подавляющими выработку ингибиторов ангиогенеза (ангио-, эндостатина), *MMPs* обеспечивают деградацию компонентов экстрацеллюлярного матрикса, а их медико-биологические эффекты являются определяющими в процессах инвазии, эпителиально-мезенхимального перехода и метастазирования опухоли [15, 16]. Повышенная экспрессия *MMPs* (*MMP1*, *MMP2*, *MMP9* и др.) в очаге поражения стимулирует опухолевую прогрессию [11, 17]. Имеются убедительные данные о связи *MMPs* с выживаемостью больных РМЖ [15].

Целью настоящего обзора является обобщение актуальных представлений о патогенетике РМЖ с позиций вовлеченности генов — кандидатов *MMPs* и их клинико-патологического значения.

Генетико-эпидемиологические исследования *MMPs*

Связь функционально значимых полиморфизмов генов *MMPs* (*MMP1*, *MMP2*, *MMP9* и др.) с риском развития РМЖ активно изучается различными научными коллективами [11, 12–24]. Интересное исследование проведено D. Ben Néjima и соавт. в туниской арабской популяции среди 210 пациенток с РМЖ и 250 здоровых женщин контрольной группы. Авторами показано, что полиморфизм -1306С/Т *MMP2* (rs243865) является протективным фактором развития РМЖ (для генотипов СТ + ТТ: отношение шансов (ОШ) 0,49, 95 % доверительный интервал (ДИ) 0,43–0,73; $p = 0,001$). Аналогично в отношении полиморфного маркера -418G/С гена *TIMP2* (rs8179090) установлено умеренное протективное действие (для генотипов GC + CC: ОШ 0,57, 95 % ДИ 0,37–0,87, $p = 0,003$). При изучении совместного действия 2 полиморфизмов продемонстрирован аддитивный эффект генотипов -1306CC *MMP2* (rs243865) и -418GC или -418CC *TIMP2* (rs8179090) ($p = 0,006$) в отношении повышенного риска развития РМЖ [18].

В метаанализе X. Zhang и соавт. рассматривались полиморфизмы *MMP9* в локусах rs17576, rs2250889, rs3918242 и rs3787268. При этом для локуса rs3918242 полиморфизма с.-1562С>Т *MMP9* продемонстрировано, что, хотя частота аллеля риска С была выше у пациенток с РМЖ, чем в контрольной группе, только генотип ТТ в рецессивной модели был достоверно связан с повышенным риском РМЖ (ТТ vs СТ + CC: ОШ 1,55, 95 % ДИ 1,12–2,16; $p = 0,009$). Остальные полиморфизмы не показали значимых связей с изучаемым заболеванием [13].

V.A. Oliveira и соавт. в бразильской популяции установили значимые ассоциации полиморфного локуса rs17576 гена *MMP9* с развитием РМЖ (для генотипа GG: ОШ 13,13, 95 % ДИ 1,73–593,08; $p = 0,003$). При этом среди пациенток в постменопаузе также продемонстрировано увеличение риска РМЖ (для генотипов AG + GG: ОШ 3,81, 95 % ДИ 0,95–19,07; $p = 0,006$), а для больных в пременопаузе не установлено значимых взаимосвязей по данному локусу [19].

В исследовании Wang K. и соавт., проведенном среди 571 пациентки с РМЖ и 578 женщин популяционного контроля изучались ассоциации полиморфных маркеров генов *MMP8* и *MMP9* (rs3740938, rs2012390, rs1940475, rs11225394, rs11225395, rs3918249, rs2274755, rs3918254 и rs3787268) с риском развития РМЖ в китайской популяции. Показано, что согласно рецессивной модели минорный аллель Т локуса

rs11225394 гена *MMP8* ассоциирован с повышенным риском развития РМЖ (ОШ 3,94, 95 % ДИ 1,10–14,07; $p = 0,019$). В доминантной модели минорный аллель А локуса rs3787268 гена *MMP8* являлся протективным фактором в отношении развития РМЖ (ОШ 0,74, 95 % ДИ 0,59–0,94; $p = 0,014$). При изучении гаплотипов *MMP8* и *MMP9* продемонстрировано, что гаплотипы AGTCA (локусы rs3740938, rs2012390, rs1940475, rs11225394 и rs11225395) и CCG (локусы rs3918249, rs3918254 и rs3787268) были ассоциированы с повышенным риском развития РМЖ: ОШ 1,23, 95 % ДИ 1,00–1,51 ($p = 0,048$) и ОШ 1,37, 95 % ДИ 1,05–1,77 ($p = 0,019$) соответственно [20].

Интересно отметить, что исследование 5 локусов (rs1799750 гена *MMP1*, rs243865 гена *MMP2*, rs11568818 гена *MMP7*, rs2252070 гена *MMP13* и rs28366003 гена *MT2A*) в польской популяции, проведенное среди 648 пациентов с различными формами рака (из них 299 составляли больные РМЖ), не выявило значимых ассоциаций с формированием изучаемого заболевания [21]. При этом для локуса rs1799750 гена *MMP1* в одном из недавних метаанализов, проведенном среди 3439 больных РМЖ и 3517 женщин контрольной группы, продемонстрирована его протективная роль в гетерозиготной модели ($p < 0,05$) [22].

В исследованиях N. Pavlova и соавт. показано, что распределение аллельных вариантов с.836 А > G (rs17576) и с.1721 С > G (rs2250889) *MMP9* значительно отличалось в группах больных РМЖ и здоровых женщин популяционного контроля, причем минорные аллели G этих SNPs (однонуклеотидных полиморфизмов) являлись протективными факторами в отношении РМЖ (в аллельной модели: ОШ 0,82, 95 % ДИ 0,68–0,99 и ОШ 0,71, 95 % ДИ 0,52–0,97 соответственно; $P_{\text{perm}} \leq 0,035$) [23]. Авторами также показано, что ожирение оказывает значительное модифицирующее влияние на ассоциацию генов *MMPs* с риском развития РМЖ у женщин в постменопаузе: полиморфные локусы *MMP9* с.836А>G (rs17576) и с.1721 С>G (rs2250889) являются протективными факторами в отношении РМЖ у женщин с ожирением (для аллельной модели: ОШ 0,71; $p = 0,047$, для аддитивной модели: ОШ 0,55; $p = 0,042$ соответственно). Генотипы ТТ *MMP2* (с.-1306 С>Т, rs243865) и АА *MMP9* (с.1331–163 G>А, rs3787268) повышали риск развития РМЖ у женщин без ожирения в рецессивной модели (ОШ 0,31; $p = 0,043$ и ОШ 2,36; $p = 0,024$ соответственно) [24].

Этим же авторским коллективом установлено, что генотип ТТ rs1940475 *MMP8* у больных РМЖ, имеющих высокопенетрантные мутации в генах *BRCA1* и *CHEK2* (3,84 %), встречается в 6–7 раз реже в сравнении как с пациентками, не имеющими этих мутаций (22,80 %, $P_{\text{perm}} = 0,04$), так и с индивидуумами

контрольной группы (26,18 %, ОШ_{cov} 0,11, 95 % ДИ_{cov} 0,01–0,81; $P_{perm} = 0,03$). Среди больных РМЖ, не имеющих высокопенетрантных мутаций в генах *BRCA1* и *CHEK2*, с заболеванием ассоциирован полиморфизм гена *MMP9*: rs17576 (ОШ_{cov} 0,81; $P_{perm} = 0,03$), rs2250889 (ОШ_{cov} 0,61–0,66; $P_{perm} = 0,03$), rs3787268 (ОШ_{cov} 2,03; $P_{perm} = 0,04$) и 9 различных гаплотипов 6 изученных локусов *MMP9* ($P_{perm} < 0,05$) [25].

Таким образом, роль однонуклеотидных полиморфизмов *MMPs* в развитии РМЖ является существенной в различных популяциях. Значимым также является совместное действие *MMPs* и их ингибиторов («рисковое» значение сочетания генотипов -1306CC *MMP2* и -418GC или -418CC *TIMP2*). Вместе с тем существуют определенные гаплотипы *MMP8* и *MMP9*, при которых также наблюдается увеличение риска РМЖ, например AGTCA (rs3740938, rs2012390, rs1940475, rs11225394 и rs11225395). При этом патогенетическая роль определенных полиморфизмов *MMPs* может зависеть от модифицирующего влияния ожирения и менструального статуса (значимые независимые факторы риска при РМЖ), например, в постменопаузе локусы rs17576 и rs2250889 гена *MMP9* являются протективными факторами в отношении РМЖ у женщин с ожирением, а локусы rs243865 гена *MMP2* и rs3787268 гена *MMP9* повышают риск развития РМЖ у женщин без ожирения. Выявлено, что полиморфный локус rs1940475 *MMP8* связан с риском развития РМЖ у женщин с высокопенетрантными мутациями в генах *BRCA1* и *CHEK2*, а полиморфизм гена *MMP9* ассоциирован с заболеванием у женщин, не имеющих данных мутаций.

Клинико-патологическое и прогностическое значение *MMPs*

Одной из первых работ этом ряду было исследование К. Przybyłowska и соавт., проведенное среди 270 пациенток с РМЖ и 300 здоровых женщин популяционного контроля. Показано, что полиморфизм rs1799750 гена *MMP1* обуславливает повышенный риск регионарного метастазирования у больных РМЖ (для генотипа 2G/2G2G: ОШ 2,14; 95 % ДИ 1,24–3,69; $p < 0,05$ и для аллеля 2G: ОШ 1,68, 95 % ДИ 1,19–2,39; $p < 0,05$), а также ассоциирован с высокой степенью злокачественности опухоли (для аллеля 2G: ОШ 2,58, 95 % ДИ 1,35–4,91; $p < 0,05$). Полиморфный маркер rs3918242 гена *MMP9* также является фактором риска, увеличивая степень злокачественности РМЖ (для аллеля Т: ОШ 2,61; 95 % ДИ 1,33–4,87; $p < 0,05$). Причем уровни экспрессии *MMP1* в образцах опухоли больных РМЖ с метастазами в лимфатические узлы (ЛУ) значимо превышали аналогичный показатель пациенток, не имеющих таких метастазов ($p < 0,05$). Повышенный уровень экспрессии *MMP9* в опухоли был ассоциирован с III степенью злокаче-

ственности РМЖ ($p < 0,05$), увеличением размера новообразования ($p < 0,05$), а также с отсутствием экспрессии рецепторов эстрогена (ER) и прогестерона (PR) ($p < 0,01$). Кроме того, экспрессия *MMP1* и *MMP9* в нормальной ткани молочной железы была значительно ниже, чем в опухолевой [11].

В исследованиях других авторских коллективов представление о роли *MMPs* в опухолевой прогрессии расширяется [26–36]. В одной из зарубежных работ рассматривались более 30 полиморфных маркеров генов *MMP1* и *MMP3* (rs484915, rs1155764, rs1799750, rs615098, rs613804, rs17361668, rs610950, rs645419, rs35068180 и др.) с целью установления их ассоциаций с инвазивным и метастатическим потенциалом РМЖ в шанхайской популяции среди 6023 женщин, однако значимых результатов не выявлено [26].

Позднее в обширном метаанализе D. Liu и соавт., проведенном среди 10 516 больных, изучен метастатический потенциал ЗНО различных типов, в том числе РМЖ, в зависимости от полиморфных маркеров промоторных областей генов *MMP1*, *MMP2*, *MMP3*, *MMP7* и *MMP9*. Показаны значимые ассоциации по локусу rs1799750 гена *MMP1* с увеличением общего риска метастазирования (для генотипа 2G/2G в рецессивной модели: ОШ 1,44, 95 % ДИ 1,05–1,98; $p = 0,03$). Однако в подгруппе РМЖ для данного локуса установлена значимая взаимосвязь с метастазированием в доминантной модели (для генотипов 2G/2G + 1G/2G: ОШ 1,59, 95 % ДИ 1,02–2,48, $I^2 = 0$ %; $p = 0,69$). Полиморфизм -1562C/Т *MMP9* (rs3918242) являлся фактором риска метастазирования только в общей группе ЗНО (для генотипов ТТ + СТ в доминантной модели: ОШ 1,25, 95 % ДИ 1,03–1,51, $I^2 = 43$ %; $p = 0,07$). Аналогичное действие характерно и для локуса -181A/G гена *MMP7* (для генотипа GG в рецессивной модели: ОШ 2,43; 95 % ДИ 1,25–4,73; $p = 0,009$). Для локуса -1306C/Т гена *MMP2* не выявлено значимых ассоциаций с метастазированием. Вместе с тем полиморфный маркер -1171 5A/6A гена *MMP3* (rs35068180) в рамках стратифицированного анализа по типу ЗНО продемонстрировал протективную роль в отношении развития метастатического РМЖ в рамках доминантной модели (для генотипов 5A/6A + 6A/6A: ОШ 0,56, 95 % ДИ 0,39–0,79, $I^2 = 0$; $p = 0,53$) [27].

F. Fu и соавт. в китайской популяции провели исследование среди 245 пациенток с РМЖ. Показаны значимые ассоциации локусов rs3787268 и rs17577 гена *MMP9* с выживаемостью больных. Так, в доминантной модели по локусу rs3787268 установлено его влияние на ухудшение показателей выживаемости и отдаленной выживаемости (для генотипов GA + AA: отношение рисков (ОР) 2,08, 95 % ДИ 1,19–3,64; $p = 0,045$ и ОР 2,89, 95 % ДИ 1,51–5,52; $p = 0,028$ соответственно). Кроме того, в доминантной модели

в подгруппах больных с опухолями размером более 2 см (ОР 1,963, 95 % ДИ 1,144–3,368; $p = 0,013$), с метастазами в ЛУ (ОР 2,528, 95 % ДИ 1,356–4,714; $p = 0,003$), со 2–3-й стадиями заболевания (ОР 2,129, 95 % ДИ 1,269–3,574; $p = 0,003$), положительным ER-статусом (ОР 2,532, 95 % ДИ 1,215–5,278; $p = 0,01$), отрицательным HER-2/neu-статусом (ОР 2,476, 95 % ДИ 1,227–4,997; $p = 0,009$) продемонстрирована худшая выживаемость среди носительниц генотипов GA и AA, с одной стороны. С другой стороны, для локуса rs17577 в доминантной модели продемонстрировано, что генотипы GA и AA обуславливают увеличение выживаемости среди пациенток с опухолями более 2 см (ОР 0,521, 95 % ДИ 0,284–0,956; $p = 0,032$), положительным ER-статусом (ОР 0,385, 95 % ДИ 0,171–0,870; $p = 0,017$), а также с отрицательным HER-2/neu-статусом (ОР 0,455, 95 % ДИ 0,211–0,979; $p = 0,039$) [28].

Исследование А. Nabel и соавт., проведенное в тунисской арабской популяции среди 430 пациенток с РМЖ и 498 здоровых женщин популяционного контроля, показало, что наличие у больных минорных аллелей полиморфных локусов -1575G/A *MMP2* (rs243866) ($p = 0,008$; $p = 0,001$), -1306C/T *MMP2* (rs243865) ($p = 0,005$; $p = 0,002$) и -790 G/A *MMP2* (rs243864) ($p = 0,015$; $p = 0,001$) ассоциировано с дисменореей и гистологическим типом РМЖ (дольковый, протоковый или смешанный) соответственно. При этом локусы -1575 G/A *MMP2* (rs243866) и -735C/T *MMP2* (rs2285053) продемонстрировали отрицательную взаимосвязь с возрастом менархе ($p = 0,031$; $p = 5,4 \times 10^{-5}$) и метастатическим потенциалом РМЖ ($p = 0,030$; $p = 0,001$) соответственно. Кроме того, наличие у пациенток аллеля Т локуса -735C/T *MMP2* (rs2285053) является протективным фактором в отношении развития трижды негативного подтипа РМЖ ($p = 0,008$), увеличения размера опухоли ($p = 0,002$), наличия отдаленных метастазов ($p = 0,001$) и чувствительности к химиотерапии ($p = 9,1 \times 10^{-5}$). Показано, что 4 изученных локуса *MMP2* находятся в сильном неравновесии по сцеплению (rs243866, rs243865, rs243864 и rs2285053), а их гаплотипы GCTT (ОШ 0,49, 95 % ДИ 0,25–0,94; $p = 2,5 \times 10^{-3}$) и GTTC (ОШ 0,39, 95 % ДИ 0,19–0,81; $p = 4,9 \times 10^{-6}$) являются протективными факторами в отношении развития РМЖ с учетом ковариат (возраста, индекса массы тела, характера менструаций, возраста менархе, грудного вскармливания, курения и применения оральных контрацептивов) [29].

А. Bartnykaitė и соавт. провели анализ вовлеченности генов *MMPs* в развитие клинико-патологических особенностей РМЖ в европейской популяции. Среди 100 больных РМЖ женщин был проведен поиск ассоциаций между 6 генетическими вариантами *MMPs* (*MMP1* rs1799750, *MMP2* rs243865, *MMP3* rs3025058,

MMP7 rs11568818, *MMP8* rs11225395, *MMP9* rs3918242) и определенными фенотипическими характеристиками: возрастом установления диагноза, размером опухоли, поражением регионарных ЛУ, рецепторным статусом опухоли, а также ее гистологическим типом, степенью злокачественности, прогрессированием и летальным исходом. Показано, что пациентки с генотипом 1G1G *MMP1* (rs1799750) демонстрировали более редкое развитие низкодифференцированного РМЖ в сравнении с генотипом 2G2G *MMP1* (rs1799750) (ОШ 0,095, 95 % ДИ 0,022–0,406; $p = 0,001$). Установлено также, что генотип GG *MMP7* (rs11568818) сильно ассоциирован (ОШ 6,562, 95 % ДИ 1,532–28,120; $p = 0,011$) с развитием низкодифференцированного РМЖ по сравнению с генотипом AA. Полиморфизм rs11225395 гена *MMP8* не показал статистически значимой связи с PR-негативным РМЖ ($p > 0,05$). Наличие аллеля С *MMP9* (rs3918242) достоверно связано со снижением вероятности HER2-позитивного РМЖ (ОШ 0,256, 95 % ДИ 0,157–0,419; $p = 0,000$). Другие молекулярные маркеры не продемонстрировали значимых взаимосвязей с РМЖ [30].

Отечественные авторы также рассматривали вовлеченность полиморфных маркеров промоторных участков генов *MMP2*, *MMP3*, *MMP9* в формирование вариантов клинического течения РМЖ в общероссийской женской популяции. Показано, что у больных РМЖ реже выявляется генотип 6A6A промотора гена -1171 5A/6A *MMP3* (rs35068180), приводящий к снижению экспрессии *MMP3* (ОШ 0,4695 % ДИ 0,30–0,72; $p = 0,00047$), что является протективным фактором в отношении развития РМЖ. Генотип -1562CC *MMP9* (rs3918242) (ОШ 0,60, 95 % ДИ 0,37–0,97; $p = 0,0389$), уменьшает экспрессию синтезируемого фермента и лимфогенное метастазирование РМЖ. Для генотипа 5A/6A отмечено повышение его частоты среди больных РМЖ (ОШ 1,61, 95 % ДИ 1,03–2,50; $p = 0,0034$), при этом снижается степень злокачественности карцином. Остальные генетические маркеры не продемонстрировали значимых ассоциаций с РМЖ [31].

В работе Н.В. Павловой и соавт. установлено, что роль полиморфных локусов генов *MMPs* в формировании РМЖ различных молекулярно-биологических подтипов неодинакова. Протективное значение для развития РМЖ люминального А- и В-подтипов имеет полиморфизм с. 836 A>G *MMP9* (rs17576, для аллеля G: ОШ 0,67–0,71), подверженность трижды негативному подтипу РМЖ связана с полиморфным локусом с. 1331–163 G>A *MMP9* (rs3787268, для генотипа AA: ОШ 4,51), а с формированием HER²⁺ РМЖ ассоциированы 2 полиморфизма генов *MMP3* (с.133 T >C, rs679620, для аллеля T: ОШ 0,46–0,49) и *MMP8* (с.259 T >C, rs1940475, для аллеля T: ОШ

Данные литературы об ассоциациях полиморфизмов генов матриксных металлопротеиназ с раком молочной железы (РМЖ)

Literature sources data of matrix metalloproteinase (MMP) genes associations with breast cancer (BC)

Chr.	SNP	Ген Gen	Количество публикаций в базах PubMed/PubMed Central Number of publications in PubMed/PubMed Central	Фенотип Phenotype	Ассоциация, уровень значимости (аллель / генотип / гаплотип) Association, level of significance (allele / genotype / haplotype)	Источник Source
11	rs1940475	MMP-8	9/25	РМЖ BC	$p > 0,05$	[33]
				Метастазы РМЖ BC metastasis	ОШ 0,60; $p = 0,03$ (T) OR 0.60; $p = 0.03$ (T)	[34]
				РМЖ BC	$p > 0,05$	[35]
					$p > 0,05$	[20]
					ОШ 1,23; $p = 0,048$ гаплотип AGTCA rs3740938, rs2012390, rs1940475, rs11225394, rs11225395 OR 1.23; $p = 0.048$ haplotype AGTCA rs3740938, rs2012390, rs1940475, rs11225394, rs11225395	[20]
	rs1799750	MMP-1	92/156	РМЖ BC	$p > 0,05$	[36]
				Метастазы РМЖ BC metastasis	$p > 0,05$	[37]
					ОШ > 1 ; $p < 0,001$ (2G) OR > 1 ; $p < 0.001$ (2G)	[11]
					ОШ 2,14; $p < 0,05$ (2G/2G) OR 2.14; $p < 0.05$ (2G/2G) ОШ 1,68; $p < 0,05$ (2G) OR 1.68; $p < 0.05$ (2G)	[11]
				Степень злокачественности РМЖ BC malignance	ОШ 2,58; $p < 0,05$ (2G) OR 2.58; $p < 0.05$ (2G)	[11]
				РМЖ с поражением ЛУ Lymph node-positive BC	ОШ 3,9; $p < 0,05$ (2G/2G) (смешанные этносы) OR 3.9; $p < 0.05$ (2G/2G) (mixed ethnicities); ОШ 2,6; $p < 0,05$ (2G/2G) (европеоиды) OR 2.6; $p < 0.05$ (2G/2G) (Caucasian)	[38]
				Сниженная выживаемость среди женщин с РМЖ Reduced survival among BC women	ОР 3,1; $p < 0,05$ (2G/2G) HR 3.1; $p < 0.05$ (2G/2G)	[38]
				РМЖ BC	$p > 0,05$	[26]
					$p > 0,05$	[39]
					$p > 0,05$	[40]
				Метастазы РМЖ BC metastasis	ОШ 2,18; $p < 0,05$ (2G/2G) OR 2.18; $p < 0.05$ (2G/2G) ОШ 1,59; $p < 0,05$ (2G/2G + 1G/2G) OR 1.59; $p < 0.05$ (2G/2G + 1G/2G)	[27]
				РМЖ BC	$p > 0,05$	[41]

Продолжение таблицы
Continuation of table

Chr.	SNP	Ген Gen	Количество публикаций в базах PubMed/ PubMed Central Number of publications in PubMed/PubMed Central	Фенотип Phenotype	Ассоциация, уровень значимости (аллель / генотип / гаплотип) Association, level of significance (allele / genotype / haplotype)	Источник Source
11	rs1799750	MMP-1	92/156	PMЖ BC	$p > 0,05$	[40]
					ОШ > 1 ; $p < 0,05$ (2G) OR > 1 ; $p < 0.05$ (2G)	[42]
					$p > 0,05$	[43]
					$p > 0,05$	[21]
					ОШ 4,86; $p = 0,0001$ (2G2G vs 1G1G) OR 4.86; $p = 0.0001$ (2G2G vs 1G1G)	[44]
					ОШ < 1 ; $p < 0,05$ (1G/2G) OR < 1 ; $p < 0.05$ (1G/2G)	[22]
11	rs679620	MMP-3	41/100	PMЖ BC	$p > 0,05$	[26]
				PMЖ (метастазы в ЛУ или отдаленные метастазы) BC (lymph node or distant metastasis)	ОШ < 1 ; $p = 0,049$ (AG) OR < 1 ; $p = 0.049$ (AG)	[32]
16	rs243865	MMP-2	92/109	PMЖ BC	ОШ 0,46; $p < 0,05$ (CT + TT vs CC) OR 0.46; $p < 0.05$ (CT + TT vs CC)	[40]
				Низкая выживаемость среди пациентов с ER-отрицательным статусом при PMЖ Poor survival among patients with ER negative of BC	$p < 0,001$ (TT vs CC + CT)	[45]
				PMЖ BC	$p > 0,05$	[46]
				Прогестероновый рецепторный статус при PMЖ BC progesterone receptor status	ОШ 2,34; $p < 0,05$ (комбинация TT rs243865 и CC rs3918242) OR 2.34; $p < 0.05$ combination TT rs243865 and CC rs3918242)	[46]
				PMЖ BC	$p > 0,05$	[47]
					ОШ 2,15; $p = 0,01$ (CC) OR 2.15; $p = 0.01$ (CC)	[48]
				PMЖ у женщин моложе 50 лет BC among women younger than 50 years of age	ОШ 2,66; $p < 0,05$ (CC) OR 2.66; $p < 0.05$ (CC)	[48]
				PMЖ BC	$p > 0,05$	[26]

Продолжение таблицы
Continuation of table

Chr.	SNP	Ген Gen	Количество публикаций в базах PubMed/ PubMed Central Number of publications in PubMed/PubMed Central	Фенотип Phenotype	Ассоциация, уровень значимости (аллель / генотип / гаплотип) Association, level of significance (allele / genotype / haplotype)	Источник Source
16	rs243865	MMP-2	92/109	РМЖ BC	$p > 0,05$	[39]
					ОШ 1,27; $p = 0,001$ (CC) OR 1.27; $p = 0.001$ (CC)	[40]
				Метастазы РМЖ / BC metastasis	$p > 0,05$	[27]
				РМЖ BC	ОШ 2,02; $p = 0,02$ (CC) OR 2.02; $p = 0.02$ (CC)	[49]
					$p > 0,05$	[50]
					$p > 0,05$	[12]
					$p > 0,05$	[51]
					$p > 0,05$	[31]
				РМЖ (суммарно европейки и азиатки) BC (summary, European and Asian)	$p > 0,05$	[52]
				РМЖ (латиноамериканки) BC (Latin-Americans)	ОШ 0,61; $p = 0,02$ (TT + TC vs CC) OR 0.61; $p = 0.02$ (TT + TC vs CC)	[52]
				РМЖ BC	ОШ 0,49; $p < 0,05$ (TT + TC vs CC) OR 0.49; $p < 0.05$ (TT + TC vs CC)	[18]
					$p > 0,05$	[53]
					ОШ 0,001; $p < 0,05$ OR 0.001; $p < 0.05$	[29]
				Гистологический тип (протоковый/дольковый/смешанный) РМЖ Histological type (ductal/lobular/mixed) of BC	$p = 0,002$	[29]
				РМЖ BC	ОШ 0,39–0,49; $p < 0,0025$ (гаплотипы GCTT и GTTC rs243866, rs243865, rs243864, rs2285053) OR 0.39–0.49; $p < 0.0025$ (haplotypes GCTT and GTTC rs243866, rs243865, rs243864, rs2285053)	[29]
					$p > 0,05$	[54]
					$p > 0,05$	[21]

Продолжение таблицы
Continuation of table

Chr.	SNP	Ген Gen	Количество публикаций в базах PubMed/ PubMed Central Number of publications in PubMed/PubMed Central	Фенотип Phenotype	Ассоциация, уровень значимости (аллель / генотип / гаплотип) Association, level of significance (allele / genotype / haplotype)	Источник Source
20	rs3918242	MMP-9	139/194	Благоприятный прогноз (непротоковый гистологический тип, положительный ER-статус и отсутствие мутации TP53) среди пациенток с РМЖ Good prognosis (non-ductal type histology, positive ER status and the absence of TP53 mutation) among BC patients	$p < 0,05$ (T)	[45]
				Метастазы РМЖ BC metastasis	$p > 0,05$	[11]
				Степень злокачественности РМЖ BC malignance	ОШ 2,61; $p < 0,05$ (T) OR 2.61; $p < 0.05$ (T)	[11]
				РМЖ BC	$p > 0,05$	[47]
					$p > 0,05$	[46]
				Прогестероновый рецепторный статус при РМЖ BC progesterone receptor status	ОШ 2,34; $p < 0,05$ (комбинация TT rs243865 и CC rs3918242) OR 2.34; $p < 0.05$ (combination TT rs243865 and CC rs3918242)	[46]
				РМЖ с поражением ЛУ Lymph node-positive BC	ОШ 3,6; $p < 0,05$ (ТТ) (смешанные этносы) OR 3.6; $p < 0.05$ (TT) (mixed ethnicities) ОШ 9,1; $p < 0,05$ (ТТ) (европеоиды) OR 9.1; $p < 0.05$ (TT) (caucasian)	[38]
				РМЖ BC	ОШ 3,27; $p = 0,004$ (T) OR 3.27; $p = 0.004$ (T)	[55]
					$p > 0,05$	[39]
					$p > 0,05$	[26]
					$p > 0,05$	[40]
				Метастазы РМЖ BC metastasis	$p > 0,05$	[27]
				РМЖ BC	ОШ > 1; $p < 0,001$ (T) OR > 1; $p < 0.001$ (T)	[56]
					ОШ 0,22; $p = 0,007$ (ТТ) OR 0.22; $p = 0.007$ (TT)	[31]
				РМЖ с поражением ЛУ Lymph node-positive BC	ОШ 0,60; $p = 0,45$ (CC) OR 0.60; $p = 0.45$ (CC)	[31]

Продолжение таблицы
Continuation of table

Chr.	SNP	Ген Gen	Количество публикаций в базах PubMed/ PubMed Central Number of publications in PubMed/PubMed Central	Фенотип Phenotype	Ассоциация, уровень значимости (аллель / генотип / гаплотип) Association, level of significance (allele / genotype / haplotype)	Источник Source
20	rs3918242	MMP-9	139/194	PMЖ BC	ОШ 1,55; $p = 0,009$ (TT vs CT + CC) OR 1.55; $p = 0.009$ (TT vs CT + CC)	[13]
					ОШ 1,87; $p = 0,035$ (T) OR 1.87; $p = 0.035$ (T)	[57]
					ОШ 1,8; $p < 0,05$ (T) OR 1.8; $p < 0.05$ (T)	[58]
					ОШ >1; $p < 0,05$ (T) OR >1; $p < 0.05$ (T)	[42]
					ОШ 4,82; $p < 0,001$ (T) OR 4.82; $p < 0.001$ (T)	[53]
					$p > 0,05$	[59]
					$p > 0,05$	[58]
					ОШ 1,34; $p = 0,028$ (T) OR 1.34; $p = 0.028$ (T)	[14]
	rs3918249	MMP-9	16/25	PMЖ BC	$p > 0,05$	[26]
					$p > 0,05$	[12]
				Отрицательный ER/PR статус PMЖ ER-/PR status of BC	ОШ 1,18; $p = 0,048$ и ОШ 0,73; $p = 0,016$ (гаплотип AT и GC rs3918261 / -rs3918249 соответственно) OR 1.18; $p = 0,048$ and OR 0.73; $p = 0,016$ (haplotype AT and GC rs3918261 / -rs3918249 respectively)	[12]
				Положительный ER/PR статус PMЖ ER+/PR status of BC	ОШ 0,71; $p = 0,044$ и ОШ 5,02; $p = 0,02$ (гаплотип GC и GT rs3918261 / -rs3918249 соответственно) OR 0.71; $p = 0.044$ and OR 5.02; $p = 0.02$ (haplotype GC and GT rs3918261 / -rs3918249 respectively)	[12]
				PMЖ BC	$p > 0,05$	[20]
					ОШ 1,37; $p = 0,019$ (гаплотип CCG rs3918249/-rs3918254/ -rs3787268) OR 1.37; $p = 0.019$ (haplotype CCG rs3918249/-rs3918254/ -rs3787268)	[20]
	rs17576	MMP-9	94/127	PMЖ BC	$p > 0,05$	[26]
				Выживаемость при PMЖ BC survival	$p > 0,05$	[28]
				PMЖ BC	ОШ 4,73; $p = 0,006$ (GG) OR 4.73; $p = 0.006$ (GG)	[60]

Продолжение таблицы
Continuation of table

Chr.	SNP	Ген Gen	Количество публикаций в базах PubMed/ PubMed Central Number of publications in PubMed/PubMed Central	Фенотип Phenotype	Ассоциация, уровень значимости (аллель / генотип / гаплотип) Association, level of significance (allele / genotype / haplotype)	Источник Source
20	rs17576	MMP-9	94/127	РМЖ BC	$p > 0,05$	[13]
					ОШ 13,13; $p < 0,003$ (GG) OR 13.13; $p < 0.003$ (GG)	[19]
				РМЖ у женщин в постменопаузе BC in postmenopausal women	$p > 0,05$	[19]
					ОШ > 1; $p < 0,006$ (GG) OR > 1; $p < 0.006$ (GG)	[19]
				РМЖ BC	$p > 0,05$	[14]
	rs3787268	MMP-9	20/33	РМЖ BC	$p > 0,05$	[26]
				Низкая безрецидивная выживаемость у больных РМЖ Poor disease-free survival of BC patients	$p = 0,045$ (AA + GA)	[28]
				Низкая отдаленная безрецидивная выживаемость у больных РМЖ Poor distance disease-free survival of BC patients	$p = 0,028$ (AA + GA)	[28]
				РМЖ BC	$p > 0,05$	[12]
				РМЖ (среди женщин с 71–100 % американским происхождением) BC (among women with the 71–100 % Native American Ancestry)	ОШ 1,52; $p = 0,037$ (AA + GA vs GG) OR 1.52; $p = 0.037$ (AA + GA vs GG)	[12]
				РМЖ BC	$p > 0,05$	[13]
					ОШ 0,82, $p = 0,025$ (A) OR 0.82, $p = 0.025$ (A)	[20]
					ОШ 1,37; $p = 0,019$ (гаплотип CCG rs3918249, rs3918254, rs3787268) OR 1.37; $p = 0.019$ (haplotype CCG rs3918249, rs3918254, rs3787268)	[20]
					$p > 0,05$	[14]
	rs2250889	MMP-9	22/38	РМЖ BC	$p > 0,05$	[26]
				Выживаемость при РМЖ BC survival	$p > 0,05$	[28]

Окончание таблицы
End of table

Chr.	SNP	Ген Gen	Количество публикаций в базах PubMed/ PubMed Central Number of publications in PubMed/PubMed Central	Фенотип Phenotype	Ассоциация, уровень значимости (аллель / генотип / гаплотип) Association, level of significance (allele / genotype / haplotype)	Источ- ник Source
20	rs2250889	MMP-9	22/38	РМЖ BC	ОШ 10,84; $p = 0,007$ (GG) OR 10.84; $p = 0.007$ (GG)	[60]
					$p > 0,05$	[13]
					ОШ 2,53; $p = 0,012$ (GG + GC vs CC) OR 2.53; $p = 0.012$ (GG + GC vs CC)	[14]
	rs17577	MMP-9	28/30	Низкая безрецидивная выживаемость среди пациенток с отрицательным ER/HER2-статусом Poor disease-free survival among ER ⁻ /epidermal growth receptor 2 (HER-2) BC patients	ОР 2,59; $p < 0,05$ (комбинация AA + GA rs3787268 и GG rs17577) HR 2.59; $p < 0.05$ (combination AA + GA rs3787268 and GG rs17577)	[28]
				Низкая отдаленная безрецидивная выживаемость среди пациенток с отрицательным ER/HER2-статусом Poor distance disease-free survival among ER ⁻ /epidermal growth receptor 2 (HER-2) BC patients	ОР 3,25; $p < 0,05$ (комбинация AA + GA rs3787268 и GG rs17577) HR 3.25; $p < 0.05$ (combination AA + GA rs3787268 and GG rs17577)	[28]

Примечание. ER – рецептор эстрогена, ЛУ – лимфатический узел, ОШ – отношение шансов, ОР – отношение рисков.
Note. ER – estrogen receptor, OR – odds ratio, HR – hazard ratio.

0,37–0,48). Согласно данным *in silico*, указанные полиморфные локусы проявляют выраженные функциональные эффекты в органах и тканях, являющихся патогенетически значимыми для заболевания, и в том числе в органе-мишени – молочной железе [32].

Таким образом, рассматривая биологическое значение генов *MMPs*, очевидно их влияние на клиническое течение РМЖ. Ряд полиморфных маркеров детерминирует процессы метастазирования: например, локус rs1799750 гена *MMP1* увеличивает метастатический потенциал, тогда как локусы rs3918242 гена *MMP9*, rs35068180 гена *MMP3*, rs243866 и rs2285053 гена *MMP2* являются протективными факторами в отношении метастазирования. В отношении степени злокачественности при РМЖ показано «рисковое» влияние локусов rs1799750 гена *MMP1* и rs11568818 гена *MMP7*, а также локуса rs3918242 гена *MMP9*. Локусы rs3787268 и rs17577 гена *MMP9* существенно ухудшают показатели выживаемости при РМЖ. Между тем определенные полиморфизмы

MMPs ассоциированы с молекулярным фенотипом опухоли. Например, локусы rs2285053 гена *MMP2* и rs3918242 гена *MMP9* уменьшают вероятность развития трижды негативного подтипа РМЖ и HER2-позитивных карцином соответственно; локус rs17576 гена *MMP9* снижает вероятность формирования РМЖ люминального А- и В-подтипов, а локус rs3787268 гена *MMP9* увеличивает риск формирования трижды негативного подтипа РМЖ. При этом полиморфные маркеры гена *MMP3* по локусу rs679620, а также гена *MMP8* по локусу rs1940475 формируют подверженность к формированию HER2-позитивного молекулярного подтипа.

Заключение

Таким образом, в базах данных PubMed/PubMed Central обнаружено несколько десятков исследований зарубежных и отечественных авторов по изучению ассоциаций полиморфизмов генов *MMPs* с формированием и течением РМЖ (см. таблицу).

При этом следует отметить, что, несмотря на убедительную патогенетическую связь *MMPs* с РМЖ, результаты ассоциативных исследований по вопросу вовлеченности функционально значимого полиморфизма генов *MMPs* в формирование заболевания, имеющиеся в настоящее время, неоднозначны и противоречивы [11–14]. Например, аллельный вариант А rs3787268 *MMP9* продемонстрировал рисковое значение для РМЖ в одной работе [12] и отсутствие ассоциаций с заболеванием в других исследованиях [13, 14]. По локусу rs1799750 гена *MMP1* ассоциация с РМЖ выявлена в 5 работах, но в 10 исследованиях такой ассоциации не обнаружено [11, 12–14]. Противоречивые данные по ассоциации с РМЖ имеются в литературе для локуса -1562 С>Т *MMP9* (rs3918242): в одних работах полиморфный вариант Т был фактором риска развития РМЖ [13, 14], по результатам других исследований этот локус не был ассоциирован с изучаемым ЗНО [26, 27, 33–36], а в одной из работ этот локус продемонстрировал снижение риска лимфогенного метастазирования при наличии генотипа СС [31],

тогда как в другой указывается только на роль генотипа ТТ в повышении общего риска РМЖ [13]. Вместе с тем работа А. Bartnykaitė и соавт. связывает аллель С локуса rs3918242 со снижением вероятности HER2-позитивных карцином молочной железы [30].

Следовательно, рассматривая полигенные механизмы РМЖ, можно отметить важную роль *MMPs* в регуляции универсальных путей канцерогенеза. Изменение экспрессии генов *MMPs* является значимым фактором развития РМЖ, обуславливая индивидуальные различия в течении и исходах заболевания. Ряд исследований, где последовательно продемонстрированы значимые взаимосвязи одноименных локусов *MMPs*, позволяют рекомендовать эти генетические маркеры в качестве прогностически значимых. Однако низкая воспроизводимость результатов имеющихся работ, а также этнотерриториальные различия изучаемых популяций диктуют необходимость продолжения исследований по этой теме, тем самым дополняя представление о роли генетических факторов в формировании и клиническом течении РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Gradishar W.J., Anderson B.O., Blair S.L. et al. National Comprehensive Cancer Network Breast Cancer Panel. Breast cancer version 3.2014. J Natl Compr Canc Netw 2014;12(4): 542–90. DOI: 10.6004/jnccn.2014.0058
2. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I. et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. Int J Cancer 2021;149:778–789. DOI: 10.1002/ijc.33588
3. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 2021;71(3):209–49. DOI: 10.3322/caac.21660
4. Пасенов К.Н. Особенности ассоциаций SHBG-связанных генов с раком молочной железы у женщин в зависимости от наличия наследственной отягощенности и мутаций в генах BRCA1/CHEK2. Научные результаты биомедицинских исследований 2024;10(1):69–88. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-1-0-4
Pasenov K.N. Features of associations of SHBG-related genes with breast cancer in women, depending on the presence of hereditary burden and mutations in the BRCA1/CHEK2 genes. Nauchie rezultaty biomedicinskih issledovaniy = Research Results in Biomedicine. 2024;10(1):69–88. (In Russ.). DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-1-0-4
5. Здравоохранение в России. 2021: Стат. сб. / Росстат. М., 2021: 171 с.
Healthcare in Russia. 2021: Stat. sb. / Rosstat. Moscow, 2021. 171 p. (In Russ.).
6. Злокачественные новообразования в России в 2022 г. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой, И.В. Лисичниковой. М., 2023: 275 с.
Malignant neoplasms in Russia in 2022. Ed.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskii, A.O. Shahzadova, I.V. Lisichkina. Moscow, 2023. 275 p. (In Russ.).
7. Lilyquist J., Ruddy K.J., Vachon C.M., Couch F.J. Common genetic variation and breast cancer risk—past, present, and future. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2018;27(4):380–94. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-17-1144
8. Michailidou K., Lindström S., Dennis J. et al. Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci. Nature 2017;551(7678):92–4. DOI:10.1038/nature24284
9. Möller S., Mucci L.A., Harris J.R. et al. The heritability of breast cancer among women in the Nordic twin study of cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2016;25(1):145–50. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0913
10. Dofara S.G., Chan S.L., Diorio C. Gene polymorphisms and circulating levels of MMP-2 and MMP-9: A review of their role in breast cancer risk. Anticancer Res 2020;40(7):3619–31. DOI: 10.21873/anticancer.14351
11. Przybyłowska K., Kluczná A., Zdrozny M. et al. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2006;95(1):65–72. DOI: 10.1007/s10549-005-9042-6
12. Slattery M.L., John E., Torres-Mejia G. et al. Matrix metalloproteinase genes are associated with breast cancer risk and survival: The breast cancer health disparities study. PLoS One 2013;8(5):e63165. DOI: 10.1371/journal.pone.0063165
13. Zhang X., Jin G., Li J., Zhang L. Association between four MMP-9 polymorphisms and breast cancer risk: A meta-analysis. Med Sci Monit 2015;21:1115–23. DOI: 10.12659/MSM.893890
14. Xu T., Zhang S., Qiu D. et al. Association between matrix metalloproteinase 9 polymorphisms and breast cancer risk: An updated meta-analysis and trial sequential analysis. Gene 2020;759:144972. DOI: 10.1016/j.gene.2020.144972
15. Radisky E.S., Radisky D.C. Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets. Front Biosci (Landmark Ed) 2015;20(7):1144–63. DOI: 10.2741/4364
16. Eiro N., Gonzalez L.O., Fraile M. et al. Breast cancer tumor stroma: Cellular components, phenotypic heterogeneity, intercellular communication, prognostic implications

- and therapeutic opportunities. *Cancers* 2019;11(5):664. DOI: 10.3390/cancers11050664
17. Baker E.A., Stephenson T.J., Reed M.W.R., Brown N.J. Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. *Mol Pathol* 2002;55(5):300–4. DOI: 10.1136/mp.55.5.300
 18. Ben Nájima D., Ben Zarkouna Y., Gammoudi A. et al. H. Prognostic impact of polymorphism of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase tissue inhibitor-2 promoters in breast cancer in Tunisia: Case-control study. *Tumor Biol* 2015;36(5): 3815–22. DOI: 10.1007/s13277-014-3023-5
 19. Oliveira V.A., Chagas D.C., Amorim J.R. et al. Association between matrix metalloproteinase-9 gene polymorphism and breast cancer in Brazilian women. *Clinics* 2020;75:e1762. DOI: 10.6061/clinics/2020/e1762
 20. Wang K., Zhou Y., Li G. et al. MMP8 and MMP9 gene polymorphisms were associated with breast cancer risk in a Chinese Han population. *Sci Rep* 2018 ;8(1):13422. DOI: 10.1038/s41598-018-31664-3
 21. Białkowska K., Marciniak W., Muszyńska M. et al. Polymorphisms in MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-13 and MT2A do not contribute to breast, lung and colon cancer risk in polish population. *Hered Cancer Clin Pract* 2020;18:16. DOI: 10.1186/s13053-020-00147-w
 22. Sui J., Huang J., Zhang Y. The MMP-1 gene rs1799750 polymorphism is associated with breast cancer risk. *Genet Test Mol Biomarkers* 2021;25(7):496–503. DOI: 10.1089/gtmb.2021.0016
 23. Pavlova N., Demin S., Churnosov M. et al. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms are associated with breast cancer in the Caucasian women of Russia. *Int J Mol Sci* 2022;23(20):12638. DOI: 10.3390/ijms232012638
 24. Pavlova N., Demin S., Churnosov M. et al. The modifying effect of obesity on the association of matrix metalloproteinase gene polymorphisms with breast cancer risk. *Biomedicines* 2022;10(10):2617. DOI: 10.3390/biomedicines10102617
 25. Павлова Н.В., Орлова В.С., Батлукская И.В. и др. Роль высокопенетрантных мутаций в генах *BRCA1* и *CHEK2* в характере ассоциаций полиморфизма генов матриксных металлопротеиназ с раком молочной железы. *Научные результаты биомедицинских исследований* 2022;8(2):180–97. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-4
 26. Pavlova N.V., Orlova V.S., Batlutskaia I.V. et al. The role of highly penetrant mutations in *BRCA1* and *CHEK2* genes in the pattern of associations of matrix metalloproteinase gene polymorphisms with breast cancer. *Nauchie rezultaty biomeditsinskih issledovaniy = Research Results in Biomedicine* 2022;8(2):180–97. (In Russ.). DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-4
 26. Beeghly-Fadiel A., Cai Q., Lu W. et al. No association between matrix metalloproteinase-1 or matrix metalloproteinase-3 polymorphisms and breast cancer susceptibility: A report from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18(4):1324–7. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0046
 27. Liu D., Guo H., Li Y. et al. Association between polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases (MMPs) and risk of cancer metastasis: A meta-analysis. *PLoS One* 2012;7(2): e31251. DOI: 10.1371/journal.pone.0031251
 28. Fu F., Wang C., Chen L.M. et al. The influence of functional polymorphisms in matrix metalloproteinase 9 on survival of breast cancer patients in a Chinese population. *DNA and Cell Biology* 2013;32(5):274–82. DOI: 10.1089/dna.2012.1928
 29. Habel A.F., Ghali R.M., Bouaziz H. et al. Common matrix metalloproteinase-2 gene variants and altered susceptibility to breast cancer and associated features in Tunisian women. *Tumour Biol* 2019;41(4):1010428319845749. DOI: 10.1177/1010428319845749
 30. Bartnykaitė A., Savukaitė A., Bekampytė J. et al. The role of matrix metalloproteinase single-nucleotide polymorphisms in the clinicopathological properties of breast cancer. *Biomedicines* 2022; 10(8):1891. DOI: 10.3390/biomedicines10081891
 31. Шевченко А.В., Коненков В.И., Гарбуков Е.Ю., Стахеева М.Н. Ассоциированность полиморфизма в промоторных участках генов металлопротеиназ (MMP2, MMP3, MMP9) с вариантами клинического течения рака молочной железы у женщин России. *Вопросы онкологии* 2014;60(5):630–35. Shevchenko A.V., Konenkov V.I., Garbukov E.Iu., Stakheeva M.N. The association of polymorphism in the promoter regions of metalloproteinase genes (MMP2, MMP3, MMP9) with variants of the clinical course of breast cancer in Russian women. *Voprosy onkologii = Oncology Issues* 2014;60(5):630–35. (In Russ.).
 32. Павлова Н.В., Пономаренко И.В., Чурносоев М.И. Особенности ассоциаций полиморфных локусов генов матриксных металлопротеиназ с различными молекулярно-биологическими подтипами рака молочной железы. *Гинекология* 2022;24(5):393–8. DOI: 10.26442/20795696.2022.5.201808
 33. Pavlova N.V., Ponomarenko I.V., Churnosov M.I. Features of associations of polymorphic loci of matrix metalloproteinase genes with various molecular biological subtypes of breast cancer. *Ginekologiya = Gynecology* 2022;24(5):393–8. (In Russ.). DOI: 10.26442/20795696.2022.5.201808
 33. Pharoah P.D., Tyrer J., Dunning A.M. et al. Association between common variation in 120 candidate genes and breast cancer risk. *PLoS Genetics* 2007;3(3):e42. DOI: 10.1371/journal.pgen.0030042
 34. Decock J., Long J.R., Laxton R.C. et al. Association of matrix metalloproteinase-8 gene variation with breast cancer prognosis. *Cancer Research* 2007;67(21):10214–21. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1683
 35. Mavaddat N., Dunning A.M., Ponder B.A. et al. Common genetic variation in candidate genes and susceptibility to subtypes of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18(1):255–9. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0704
 36. Biondi M.L., Turri O., Leviti S. et al. MMP1 and MMP3 polymorphisms in promoter regions and cancer. *Clin Chem* 2000;46:2023–4. PMID: 11106348
 37. Ghilardi G., Biondi M.L., Erario M. et al. Colorectal carcinoma susceptibility and metastases are associated with matrix metalloproteinase-7 promoter polymorphisms. *Clin Chem* 2003;49(11):1940–2. DOI: 10.1373/clinchem.2003.018911
 38. Hughes S., Agbaje O., Bowen R.L. et al. Matrix metalloproteinase single-nucleotide polymorphisms and haplotypes predict breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 2007;13(22 Pt. 1):6673–80. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0884
 39. McColgan P., Sharma P. Polymorphisms of matrix metalloproteinases 1, 2, 3 and 9 and susceptibility to lung, breast and colorectal cancer in over 30,000 subjects. *Int J Cancer* 2009;125(6):1473–8. DOI: 10.1002/ijc.24441
 40. Zhou P., Du L.F., Lu G.Q. et al. Current evidence on the relationship between four polymorphisms in the matrix metalloproteinases (MMP) gene and breast cancer risk: A meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2011;127(3):813–8. DOI: 10.1007/s10549-010-1294-0
 41. Su C.H., Lane H.Y., Hsiao C.L. et al. Matrix metalloproteinase-1 genetic polymorphism in breast cancer in Taiwanese. *Anticancer Res* 2016;36(7):3341–5. PMID: 27354592
 42. Padala C., Tupurani M.A., Puranam K. et al. Synergistic effect of collagenase-1 (MMP1), stromelysin-1 (MMP3) and gelatinase-B (MMP9) gene polymorphisms in breast cancer. *PLoS One* 2017;12(9):e0184448. DOI: 10.1371/journal.pone.0184448
 43. Hsiao C.L., Liu L.C., Shih T.C. et al. The association of matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphisms with breast cancer. *In Vivo* 2018; 32:487–91. DOI: 10.21873/invivo.11265
 44. Balkhi S., Mashayekhi F., Salehzadeh A., Saedi H.S. Matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 gene variations affect MMP-1 and -3 serum concentration and associates with breast

- cancer. *Mol Biol Rep* 2020;47(12):9637–44. DOI: 10.1007/s11033-020-05962-x
45. Grief F., Li W.Q., Iacopetta B.J. Genetic polymorphisms in the MMP-2 and MMP-9 genes and breast cancer phenotype. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 88(3):197–204. DOI: 10.1007/s10549-004-0595-6
 46. Lei H., Hemminki K., Altieri A. et al. Promoter polymorphisms in matrix metalloproteinases and their inhibitors: few associations with breast cancer susceptibility and progression. *Breast Cancer Res Treat* 2007;103(1):61–9. DOI: 10.1007/s10549-006-9345-2
 47. Roeh A.V., Frazzon A.P.G., Agnes G. et al. Detection of polymorphisms in the promoters of matrix metalloproteinases 2 and 9 genes in breast cancer in South Brazil: preliminary results. *Breast Cancer Res Treat* 2007;102(1):123–4. DOI: 10.1007/s10549-006-9273-1
 48. Delgado-Enciso I., Cepeda-Lopez F.R., Monroy-Guizar E.A. et al. Matrix metalloproteinase-2 promoter polymorphism is associated with breast cancer in a Mexican population. *Gynecol Obstet Investig* 2007;65(1):68–72. DOI: 10.1159/000108282
 49. Saeed H.M., Alanazi M.S., Alshahrani O. et al. Matrix metalloproteinase-2 C(-1306)T promoter polymorphism and breast cancer risk in the Saudi population. *Acta Biochim Pol* 2013;60(3):405–9. PMID: 24051440
 50. Zagouri F., Sergentanis T.N., Gazouli, M. et al. MMP-2 -1306C>T polymorphism in breast cancer: A case-control study in a South European population. *Mol Biol Rep* 2013;40(8): 5035–40. DOI: 10.1007/s11033-013-2604-5
 51. Ledwoń J., Hennig E.E., Maryan N. et al. Common low-penetrance risk variants associated with breast cancer in Polish women. *BMC Cancer* 2013;13:510. DOI: 10.1186/1471-2407-13-510
 52. Yang L., Li N., Wang, S. et al. Lack of association between the matrix metalloproteinase-2 -1306C>T polymorphism and breast cancer susceptibility: A meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(12):4823–7. DOI: 10.7314/apjcp.2014.15.12.4823
 53. Manshadi Z.D., Hamid M., Kosari F. et al. The Relationship between matrix metalloproteinase gene polymorphisms and tumor type, tumor size, and metastasis in women with breast cancer in Central Iran. *Middle East J Cancer* 2018; 9(2):123–31.
 54. Ou Y.X., Bi R. Meta-analysis on the relationship between the SNP of MMP-2-1306 C>T and susceptibility to breast cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020;24(3):1264–70. DOI: 10.26355/eurrev_202002_20181
 55. Sadeghi M., Motovali Bashi M., Hojati Z. MMP-9 promoter polymorphism associated with tumor progression of breast cancer in Iranian population. *Int J Integr Biology* 2009;6:33–7.
 56. Chiranjeevi P., Spurthi K.M., Rani N.S. et al. Gelatinase B (-1562C/T) polymorphism in tumor progression and invasion of breast cancer. *Tumor Biol* 2013;35(2):1351–6. DOI: 10.1007/s13277-013-1181-5
 57. Rahimi Z., Yari K., Rahimi Z. Matrix metalloproteinase-9 -1562 T allele and its combination with MMP-2 -735 C allele are risk factors for breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16:1175–9. DOI: 10.7314/apjcp.2015.16.3.1175
 58. AbdRaboh N.R., Bayoumi F.A. Gene polymorphism of matrix metalloproteinases 3 and 9 in breast cancer. *Gene Rep* 2016;5:151–6. DOI: 10.1016/j.genrep.2016.10.007
 59. Felizi R.T., Veiga M.G., Filho I.C. et al. Association between matrix metalloproteinase 9 polymorphism and breast cancer risk. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2018;40:620–4. DOI: 10.1055/s-0038-1673366
 60. Chahil J.K., Munretnam K., Samsudin N. et al. Genetic polymorphisms associated with breast cancer in Malaysian cohort. *Indian J Clin Biochem* 2015;30(2):134–9. DOI: 10.1007/s12291-013-0414-0

Вклад авторов

Н.В. Павлова: обзор публикаций по теме статьи, анализ и выводы, редактирование статьи;
 С.С. Дёмин: написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи, редактирование статьи;
 М.И. Чурносков: обзор публикаций по теме статьи, анализ результатов, редактирование статьи;
 И.В. Пономаренко: обзор публикаций по теме статьи, анализ изученных данных, редактирование статьи.

Author's contributions

N.V. Pavlova: literature review on the article's topic, analysis, and conclusions, editing of the article;
 S.S. Dyomin: manuscript writing, literature review on the article's topic, editing of the article;
 M.I. Churnosov: literature review on the article's topic, analysis of results, editing of the article;
 I.V. Ponomarenko: literature review on the article's topic, analysis of reviewed data, editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

Н.В. Павлова / N.V. Pavlova: <https://orcid.org/0000-0002-7754-5231>
 С.С. Дёмин / S.S. Dyomin: <https://orcid.org/0000-0002-9956-4775>
 М.И. Чурносков / M.I. Churnosov: <https://orcid.org/0000-0003-1254-6134>
 И.В. Пономаренко / I.V. Ponomarenko: <https://orcid.org/0000-0002-5652-0166>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Funding. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 31.08.2023. Принята в печать: 05.03.2024.

Article submitted: 31.08.2023. Accepted for publication: 05.03.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-25-35>

Экспрессионные характеристики опухоли как прогностические и предиктивные маркеры резектабельного и местно-распространенного колоректального рака

Г.Г. Макиев^{1,2}, М.Ю. Федянин^{1,3,4}, Е.О. Игнатова⁵, О.А. Кузнецова¹, Я.Е. Чихарева¹, А.А. Трякин¹

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

²ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. акад. Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства»; Россия, 119435 Москва, Малая Пироговская ул., 1А;

³ГБУЗ г. Москвы «Московский многопрофильный клинический центр «Коммунарка» Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 108814 Москва, ул. Сосенский Стан, 8;

⁴ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 105203 Москва, ул. Нижняя Первомайская, 70;

⁵Исследовательский институт Сары Кэннон; Великобритания, W1G 6AD Лондон, Харли-стрит, 93

Контакты: Георгий Георгиевич Макиев mak.geor@yandex.ru

Введение. Риски рецидива и смерти пациентов с колоректальным раком (КРР) могут значительно различаться даже у пациентов со схожими клиничко-патоморфологическими особенностями из-за высокого уровня гетерогенности опухоли. Существующие молекулярные классификации имеют довольно ограниченное значение. Возможно, большую роль будут иметь генные сигнатуры, выделенные с помощью полноэкзомного/полнотранскриптомного анализов.

Цель исследования – систематизирование данных литературы, посвященных экспрессионным сигнатурам, описание их прогностического и предиктивного значения в контексте неметастатического КРР.

Результаты. В данном обзоре описаны современные аспекты персонализации подходов к лечению КРР, применяемые в клинической практике: мутационный и микросателлитный статусы, значение локализации первичной опухоли. Представлены также данные по мультигенным сигнатурам, экспрессионным характеристикам опухоли. Ряд сигнатур позволяют предсказать риск рецидива, безрецидивную и общую выживаемость резектабельного и местно-распространенного КРР. Кроме того, показана корреляция лекарственной чувствительности с сигнатурами генов репарации ДНК, представлены данные по корреляции экспрессионных сигнатур с белками, фосфопротеинами и их роль как прогностических и предиктивных факторов неметастатического КРР.

Заключение. Применение генных сигнатур на сегодняшний момент не имеет практического значения. Ввиду разрозненности данных, большого разнообразия исследуемых сигнатур сделать какие-то значимые выводы по их практическому значению невозможно. Однако, вероятно, в будущем использование генных сигнатур приведет к более точному определению прогноза, новым подходам к лекарственной терапии и улучшению результатов лечения пациентов с КРР.

Ключевые слова: колоректальный рак, генные сигнатуры, экспрессия генов, мутации, молекулярные подтипы

Для цитирования: Макиев Г.Г., Федянин М.Ю., Игнатова Е.О. и др. Экспрессионные характеристики опухоли как прогностические и предиктивные маркеры резектабельного и местно-распространенного колоректального рака. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(2):25–35.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-25-35>

Expression characteristics of tumors as prognostic and predictive markers for resectable and locally advanced colorectal cancer

Georgii G. Makiev^{1,2}, Mikhail Yu. Fedyanin^{1,3,4}, Ekaterina O. Ignatova⁵, Olesya A. Kuznetsova¹, Yana E. Chikhareva¹, Alexey A. Tryakin¹

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

²*Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency; 1A Malaya Pirogovskaya St., Moscow 119435, Russia;*

³*Moscow Multidisciplinary Clinical Center "Kommunarka"; 8 Sosenskiy Stan St., Moscow 108814, Russia;*

⁴*National Medical and Surgical Center named after N.I. Pirogov, Ministry of Health of Russia, 70 Nizhnyaya Pervomaiskaya St., Moscow 105203, Russia;*

⁵*Sarah Cannon Research Institute; 93 Harley Street, W1G 6AD London, UK*

Contacts: Georgii Georgievich Makiev mak.geor@yandex.ru

Background. The risks of recurrence and death in patients with colorectal cancer (CRC) can vary significantly, even among patients with similar clinicopathological features, due to the high level of tumor heterogeneity. Existing molecular classifications have relatively limited value. Gene signatures identified through whole-exome/whole-transcriptome analyses may play a more significant role.

Aim. To systematize literature data on expression signatures and describe their prognostic and predictive value in the context of non-metastatic CRC.

Results. This review describes contemporary aspects of personalized approaches in the treatment of CRC applied in clinical practice: mutational and microsatellite status, the significance of the primary tumor's location. Data on multi-gene signatures and tumor expression characteristics are also presented. Several signatures allow predicting the risk of recurrence, disease-free, and overall survival in resectable and locally advanced CRC. Additionally, the correlation between drug sensitivity and DNA repair gene signatures is demonstrated. Data on the correlation of expression signatures with proteins, phosphoproteins, and their role as prognostic and predictive factors in non-metastatic CRC are provided.

Conclusion. The practical application of gene signatures currently lacks significance. Due to the scattered nature of data and the wide variety of examined signatures, making meaningful conclusions about their practical value is impossible. However, it is possible that in the future, the use of gene signatures will lead to a more accurate prognosis, new approaches to drug therapy, and improved outcomes for patients with CRC.

Keywords: colorectal cancer, gene signatures, gene expression, mutations, molecular subtypes

For citation: Makiev G.G., Fedyanin M.Yu., Ignatova E.O. et al. Expression characteristics of tumors as prognostic and predictive markers for resectable and locally advanced colorectal cancer. *Rossiiskij bioterapevticeskij zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2024;23(2):25–35. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-25-35>

Введение

Колоректальный рак (КРР) является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований, занимающий 2-е место среди причин смерти от рака во всем мире [1]. В настоящий момент наибольшее значение для принятия клинических решений при КРР имеют распространенность опухоли, статус микросателлитной нестабильности (MSI) и статус мутаций генов *RAS*, *BRAF*, аalterации *HER2*. Однако риски рецидива и смерти могут значительно различаться у пациентов со схожими клинико-патоморфологическими особенностями из-за высокого уровня молекулярной гетерогенности [2]. Необходим поиск новых прогностических и предиктивных характеристик для более точного определения риска у пациентов с КРР.

Существует понятие о молекулярных подтипах КРР, тем не менее эта классификация имеет ограниченное клиническое применение. В других нозологиях выделение генных сигнатур позволяет оценить риск прогрессирования заболевания, определить возможную эффективность лекарственного лечения. Например, М. Sinkala и соавт. провели пан-опухоле-

вое исследование для характеристики подтипов опухолей на основе паттернов экспрессии генов, связанных с метаболическими путями. В этой работе на основе полученных данных 32 вида рака разделены на 2 типа, которые продемонстрировали достоверные различия в показателях выживаемости [3]. Следовательно, существует необходимость в определении надежных биомаркеров, основанных на анализе экспрессии генов, которые могут стать частью клинической практики.

Молекулярно-генетические маркеры, используемые в клинической практике

Объем молекулярно-генетической диагностики КРР включает в себя мутационный статус *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* и *MSI*-статус, экспрессию или амплификацию *HER-2/neu* [4]. Наличие *MSI*-фенотипа является предиктором эффективности иммунотерапии [5]. Активирующие мутации в *KRAS*, *NRAS* и *HRAS* (mut) в совокупности присутствуют примерно в 1/2 случаев КРР. Мутация V600E гена *BRAF* возникает по разным данным в 10–15 % случаев у пациентов на ранних стадиях КРР, приблизительно в 5 % —

на IV стадии и является фактором негативного прогноза для КРР [6]. Четко показано значение *RAS*, *BRAF*, *HER-2/neu* как негативных предиктивных факторов анти-EGFR терапии. В то же время среди опухолей с диким типом (wt) генов *RAS/BRAF* на выбор таргетной терапии в 1-й линии влияет такой клинический фактор, как локализация первичной опухоли, что говорит о наличии более сложных молекулярно-генетических различий между опухолями [6]. Ввиду того, что правые и левые отделы толстой кишки имеют различное эмбриональное происхождение, существуют также клинические и молекулярные отличия. Так, в крупном ($n = 1913$) анализе G. Hutchins и соавт. мутации в генах *KRAS* и *BRAF* чаще встречались при правосторонней локализации: 40 % против 28 % и 17 % против 2 % соответственно [7]. Показана также связь мутаций *BRAF* с MSI и с более низкой выживаемостью [8].

Ввиду разных молекулярно-биологических особенностей право- и левосторонней локализации КРР существуют и отличия в терапевтических подходах. В случае отсутствия мутации *RAS/BRAF* рекомендуется добавление к химиотерапии анти-EGFR-моноклональных антител (цетуксимаба или панитумумаба) при локализации первичной опухоли в левых отделах толстой кишки. Бевацизумаб рекомендуется добавлять к химиотерапии при наличии мутации *RAS* или *BRAF*, а при наличии нерезектабельных метастазов — вне зависимости от статуса *RAS/BRAF* и локализации первичной опухоли в правом отделе. Добавление анти-EGFR-антител также рекомендуется при наличии потенциально резектабельных метастазов и wt независимо от локализации первичной опухоли. Это связано с тем, что назначение комбинаций с анти-EGFR-препаратами приводит к более выраженному уменьшению проявлений болезни, которое наступает раньше, чем на комбинациях с бевацизумабом [9]. Различия в выживаемости КРР разных локализаций сложно свести только к мутации *BRAF* или MSI. Еще в прошлом десятилетии было понятно: более широкие геномные данные внесут ясность в понимание отличий правой и левой локализаций КРР. V. Popovici и соавт. в 2012 г. использовали набор из 668 образцов КРР II и III стадий из исследования PETACC-3. Их задачей была оценка отличий в профилях экспрессии генов между mutKRAS/BRAF, их wt и двойным wt. В данном исследовании выделен так называемый BRAF-подобный, или CIMP⁺ фенотип (CpG island methylator phenotype). Субпопуляция пациентов с wtBRAF (30 % мутантов KRAS, 13 % двойного wt) показала схожий паттерн экспрессии генов и имела низкую общую (ОВ) и безрецидивную (БРВ) выживаемость, аналогичную тем, которые наблюдались у BRAF-мутантов. Таким образом, эти пациенты образуют отдельную прогно-

стическую подгруппу в пределах своего класса мутаций [10].

Следующим этапом стало изучение циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК). В 2023 г. были доложены результаты исследования PARADIGM. В этой работе пациенты с метастатическим wtRAS (по цоДНК) КРР получали химиотерапию в режиме mFOLFOX6 с панитумумабом или бевацизумабом. У пациентов с левосторонним метастатическим КРР (мКРР), большая медиана ОВ наблюдалась в группе, получавшей панитумумаб (37,9 мес), по сравнению с теми, кто получал бевацизумаб (34,3 мес; отношение рисков (ОР) 0,82; $p = 0,031$), в то время как у пациентов с правосторонними опухолями ОР составило 1,09. Вместе с тем исследователи также использовали исходную цоДНК для определения мутаций *KRAS*, *NRAS*, *PTEN* и внеклеточного домена EGFR, амплификации *HER-2* и *MET*, а также транслокации *ALK*, *RET* и *NTRK*. Авторы выделили суперселективный фенотип без указанных изменений (72 % пациентов). Интересно, что выживаемость без признаков болезни (ВБПБ) была больше и ОВ была аналогична или больше при приеме панитумумаба по сравнению с бевацизумабом, и это не зависело от локализации (ОР варьирует от 0,76 до 0,82) [11]. Таким образом, детальный анализ мутационного профиля позволяет свести на нет предиктивную значимость локализации первичной опухоли. Значение локализации КРР, которое используется в практической онкологии, — это просто суррогат изменений в генах. Между тем в аннотации исследования PARADIGM, представленного на ASCO 2023 г., указано, что можно ограничить панель RAS, BRAF, MSS (также по цоДНК). Тогда и при правосторонней локализации начинает «выигрывать» по ОВ панитумумаб по сравнению с бевацизумабом (37,9 vs 30,9), что ставит под вопрос необходимость применения таких широких панелей [12]. Однако ближайший этап развития лечения КРР в данном контексте — это, по-видимому, использование цоДНК для негативной суперселекции с целью назначения анти-EGFR-терапии.

Концепция молекулярных подтипов колоректального рака

Существует несколько классификаций КРР на основе молекулярных характеристик, но наиболее важным достижением в данном направлении стала разработка подтипов CMS (consensus molecular subtypes) на 18 наборах данных экспрессии генов ($n = 4151$ пациент) с разбросом по стадиям согласно доступным данным: I — 12 %, II — 39 %, III — 41 %, IV — 8 % при $n = 2952$ [13–15]. Выделено 5 вариантов, которые отличались по экспрессионным или транскриптомным данным, а также по ряду клинических и молекулярных характеристик, в частности по микросателлитному

статусу, уровню изменения числа соматических копий и некоторым мутациям. Распространенность данных подтипов среди пациентов с нематастатическим КРР (не-мКРР) составляет: CMS1 (MSI-фенотип) — 14 % пациентов, CMS2 (канонический) — 37 %, CMS3 (метаболический) — 13 %, CMS4 (мезенхимальный) — 23 %, UNK (неклассифицируемый) — 13 % [15]. Наибольшее количество данных о значении CMS накоплено именно у пациентов с распространенным заболеванием. Данные по прогностическому и предиктивному значениям подтипов CMS при не-мКРР довольно ограничены и еще более неоднозначны. Система классификации CMS обладает прогностическим потенциалом у пациентов с КРР III стадии, проходящих адъювантную химиотерапию (АХТ) в режиме FOLFOX. В исследовании A. Okita и соавт. показано, что пациенты в CMS2, 3 продемонстрировали значительное преимущество в ОВ ($p = 0,019$), а также тенденцию к улучшению ВБПБ ($p = 0,104$) при проведении АХТ в ранее указанном режиме [16]. Более конкретно: анализ выживаемости с использованием групп CMS1, 2 и 3 показал, что у пациентов в CMS2 и 3 группах были выше ВБПБ ($p = 0,039$) и ОВ ($p = 0,027$), по сравнению с группой CMS1, а при анализе групп CMS2, 3 и 4 не наблюдалось существенной разницы в выживаемости [17]. Использование оксалиплатин-содержащей АХТ при подтипе с наиболее неблагоприятным прогнозом при локализованном КРР — CMS4, в исследовании N. Song и соавт. (II и III стадии) продемонстрировало тенденцию к увеличению ОВ в сравнении с монотерапией 5-фторурацилом [18]. В данной работе польза от добавления оксалиплатина была достоверна только в энтероцитарном подтипе КРР (по другой классификации КРР — CRCA), однако не подтвердилась в когорте валидации. В работе W. Allen и соавт. (II и III стадий) также показана аналогичная тенденция при CMS4 у пациентов, получавших АХТ, в сравнении с только хирургическим лечением [19]. В работе Y. Li и соавт. (II стадия) показано, что АХТ в сравнении только с хирургическим лечением значительно снижала 5-летнюю БРВ, с 83,3 до 30,0 % ($p = 0,040$), с тенденцией к уменьшению 5-летней ОВ у пациентов с CMS4 [20]. В этом же исследовании в подтипах CMS2/3, которые характеризуются наиболее благоприятным течением и демонстрируют увеличение ОВ при использовании АХТ, обнаружено увеличение ОВ только при левосторонней локализации. В исследовании K. Rogue-Geile и соавт., проведенном на пациентах исследования MOSAIC, напротив, не показано корреляционной связи между подтипами CMS и пользы от добавления оксалиплатина [21]. В целом, несмотря на ряд сходных данных по прогностической значимости CMS, сведения по их предиктивной значимости противоречивы.

Существующая молекулярно-генетическая классификация опухолей имеет ряд ограничений, которые можно объяснить выраженной гетерогенностью опухолей, внутриопухолевой гетерогенностью стромального происхождения, микроокружением опухоли, изменением превалирующего подтипа в опухоли в процессе лечения. В исследовании P. Dunne и соавт. изучили экспрессионные данные в различных участках первичной опухоли. Только 46 % образцов были однозначно классифицированы в соответствии с CMS [22]. В работе P. Piskol и соавт. при изучении 182 образцов первичной опухоли и 130 метастазов конкордантность по CMS между первичной опухолью и метастазами составила всего 60 % [23]. Исследуемые терапевтические подходы при различных молекулярно-генетических подтипах, как представлялось выше, также имеют неоднозначное значение. Например, имеются данные об эффективности комбинации антиангиогенных препаратов и ингибиторов контрольных точек иммунитета при мезенхимальном подтипе. Однако данные подходы работали только при MSI-фенотипе [24]. Бевацизумаб не работал и при CMS4, несмотря на то что при нем выражена экспрессия проангиогенных факторов [25]. В исследовании ESMO Open (European Society for Medical Oncology) 2021 г., наряду со значимыми ассоциациями CMS и CRCA с БРВ и ОВ, эффект интенсификации лечения не зависел от молекулярных подтипов [26]. На ASCO 2023 г. представлены данные, показывающие отличия по CMS рака толстой и прямой кишки: рак прямой кишки имел значительно лучшую БРВ при CMS2 и 4 по сравнению с раком толстой кишки [27]. Это указывало на различия в биологии заболевания, которые не были учтены при подтипировании CMS. Приведенные ограничения наиболее значимой классификации подтипов КРР — CMS, а также отсутствие четких результатов использования различных терапевтических подходов указывают на необходимость поиска более значимых экспрессионных/транскрипционных данных.

Поиск отдельных генных сигнатур

В опухолевых тканях нарушения экспрессии генов, вызванные генетическими или эпигенетическими явлениями, могут быть оценены с помощью генных сигнатур. Генная сигнатура, или сигнатура экспрессии генов, — это отдельная или объединенная группа генов в клетке с уникальным характерным паттерном экспрессии генов. В связи с развитием омиксных технологий, включая новые методики секвенирования (полноэкзомное секвенирование — WES, полнотранскриптомное секвенирование — WTS, полнометилонное секвенирование — WGBS), появилось множество баз данных, доступных для анализа [28]. Ожидается, что множественные омиксные

характеристики будут способствовать персонализации терапевтических подходов, что приведет к улучшению результатов лечения. Уже разработаны несколько тестов на основе подобных данных, например ColoPrint. В исследовании S. Kopetz и соавт. использование данного теста у пациентов со II стадией КРР позволило отличить пациентов с высоким и низким риском рецидива по 5-летней БРВ даже в тех случаях, когда клинические факторы высокого риска не указывали на отличия [29]. На ASCO 2023 г. были представлены данные по применению 12-генной сигнатуры OncoPrint DX среди пациентов со II стадией КРР. Результаты оценки риска рецидива по данному тестированию представляют независимую прогностическую информацию, однако достоверно не отличаются в каждой группе между получившими АХТ и только прооперированными пациентами. В группе высокого риска рецидива была показана численная польза от АХТ по 5-летней БРВ и ОВ [30]. В ряде исследований экспрессия нескольких значимых генов была связана с низкой ОВ [31, 32]. Например, ген *Stanniocalcin 2* (*STC2*) связан с неблагоприятным прогнозом при КРР. Более высокая экспрессия *STC2* достоверно стратифицировала пациентов в соответствии с ОВ [33].

Мультигенные сигнатуры неметастатического колоректального рака

Количественное определение отдельных генов как прогностических маркеров удобно в использовании, однако их применение ограничено гетерогенностью опухолей. Практически невозможно также установить биологическую значимость отдельных генов из-за отсутствия согласованности между различными исследованиями и существенной вариабельности их результатов. Использование мультигенных сигнатур концептуально и практически достигает более высокой точности по сравнению с прогностическим значением отдельных генов. Информация об экспрессионных сигнатурах в контексте резектабельного и местно-распространенного КРР представлена довольно ограничено. Исследования в данной области рассматривают преимущественно все стадии КРР. Ввиду этого все работы, описанные далее, включают большую часть пациентов с I–III стадиями КРР, а именно не менее 80 % выборки. Забегая вперед, нужно отметить, что выделить какие-либо четкие отличия по генным сигнатурам между мКРР и не-мКРР на данный момент не удалось. Между тем есть отдельные данные. Например, П. Ершов и соавт. из 301 hub-гена, описанных в 40 статьях, выделили *MMP3*, *THBS2*, *TIMP1* и *CXCL12*, ассоциированные с метастатическим процессом [34]. В работе P. Ahluwalia и соавт. идентифицировали и клинически подтвердили новую генную сигнатуру для

улучшения прогнозирования ОВ. На основании баз TCGA, COAD и TPA из 595 генов-кандидатов была выделена панель из 17 генов с наибольшими отклонениями. Панель генов протестирована на тканях пациентов с КРР, среди которых 80 % представляли собой не-мКРР. Установлено, что высокий прогностический балл, подразумевающий комбинированную 4-генную сигнатуру (*DPP7/2*, *YWHA8*, *MCM4* и *FBXO46*), является значимым предиктором плохого прогноза у пациентов с КРР наряду со стадией, что было подтверждено внешней валидацией. Кроме того, более высокий балл позволил дифференцировать пациентов II и III стадий (130 пациентов) на основе ОВ [35]. В исследовании W. Chang и соавт. с одним из наибольших по числу пациентов в собственном наборе (1097 пациентов), куда включался только не-мКРР, выделена когорта с 4-генной сигнатурой (*GRB2*, *PTPN11*, *ITGB1* и *POST*), характеризующаяся более высоким риском прогрессирования как во внутренней, так и в валидационной когортах [36]. В таблице описан ряд подобных исследований с перечнем генов, использованных баз данных, а также прогностическим значением выделенных генных сигнатур. Таким образом, экспрессионные сигнатуры однозначно имеют прогностическую ценность. Однако ряд проблем, например таких как разрозненность данных, большое разнообразие исследуемых сигнатур, еще предстоит решить.

Сигнатуры генов репарации ДНК и попытки корреляции с лекарственной чувствительностью

Попытки корреляции лекарственной чувствительности с различными генетическими альтерациями проводятся уже давно. Известны примеры связи чувствительности к различным химиотерапевтическим агентам с альтерациями, которые напрямую связаны с механизмами действия таких препаратов. Один из компонентов механизма эксцизионной репарации ДНК — ERCC1 — участвует в устранении аддуктов, являющихся следствием действия препаратов платины, в частности оксалиплатина. В ряде локализаций были попытки связать полиморфизм этого гена с чувствительностью на терапию оксалиплатином и показать его прогностическое значение, однако полученные результаты кажутся неубедительными [44]. В целом не получено достоверных данных, указывающих на чувствительность к оксалиплатин-содержащим режимам лечения или корреляции между экспрессией ERCC1 и БРВ, ОВ. Не получено также убедительных данных по прогнозированию ответа на 5-фторурацил по уровню экспрессии тимидилатсинтазы, ингибирование которой связано с активностью 5-фторурацила [45]. Подобные попытки предиктивного использования генетических

Характеристики и результаты исследований генных сигнатур

Characteristics and results of gene signature studies

Автор, ссылка Author, source	Число пациентов, базы данных Number of patients, databases	Генная сигнатура Gene signature	Результат Result
Ahluwalia P. и соавт. [35] Ahluwalia P. et al. [35]	TCGA, COAD и The Human Protein Atlas ($n = 597$). Внешняя валидация — оригинальные данные ($n = 88$), GEO ($n = 122$) TCGA, COAD and The Human Protein Atlas ($n = 597$). External validation — original data ($n = 88$), GEO ($n = 122$)	<i>DPP7/2, YWHAB, MCM4, FBXO46</i>	Указанная сигнатура — значимый предиктор плохого прогноза у пациентов с КРР (ОР 3,42, 95 % ДИ 1,71–7,94; $p < 0,001$). Позволила дифференцировать пациентов II и III стадий на основе ОВ (ОР 2,5, 95 % ДИ 1,78–3,63; $p < 0,001$) This signature is a significant predictor of poor prognosis in patients with CRC (HR 3.42, 95 % CI 1.71–7.94; $p < 0.001$). It allowed differentiation of stage II and III patients based on the OS (HR 2.5, 95 % CI 1.78–3.63; $p < 0.001$)
Chang W. и соавт. [36] Chang W. et al. [36]	Оригинальные данные ($n = 1097$, I–III стадии), валидация на GEO Original data ($n = 1097$, stages I–III), validation at GEO	<i>GRB2, PTPN11, ITGB1, POST</i>	Корреляция с высоким риском прогрессирования как в исследуемой (ОР 3,53, 95 % ДИ 2,13–5,84), так и в валидационной когорте Correlation with high risk of progression in both the study cohort (HR 3.53, 95 % CI 2.13–5.84) and the validation cohort
Dong C. и соавт. [37] Dong C. et al. [37]	GEO ($n = 814$), TCGA ($n = 383$)	<i>LRP2, HEYL, CUBN, SFRP2, GADD45B, IGFBP3, LEF1, CCNE1</i>	Корреляция с ОВ и БРВ. Также генная сигнатура позволила разделить пациентов на подгруппы низкого и высокого риска (ОР 2,38, 95 % ДИ 1,46–3,87; $p < 0,001$) Correlation with OS and DFS. The gene signature also allowed the investigators to categorize patients into low- and high-risk subgroups (HR 2.38, 95 % CI 1.46–3.87, $p < 0.001$)
Hong J. и соавт. [38] Hong J. et al. [38]	GEO, валидация на TCGA GEO, validation at TCGA	<i>RPX, CXCL13, MMP10, FABP4, CLDN23</i>	Прогностическое значение по 1, 3, 5-летней выживаемости (значения AUC 0,68, 0,632, 0,675 соответственно, аналогично в валидационной когорте) Prognostic value by 1, 3, 5-year survival (AUC values 0.68, 0.632, 0.675, respectively, similar in the validation cohort)
Sveen A. и соавт. [39] Sveen A. et al. [39]	Оригинальные данные ($n = 172$, II–III стадии), валидация на GEO ($n = 215$) Original data ($n = 172$, stages II–III), validation on GEO ($n = 215$)	<i>OLFM4, SEMA3A, CXCL9, UGT2B17, NT5E, WNT11, DMBT1</i>	Достоверная стратификация пациентов в соответствии с выживаемостью ОР 2,9 (95 % ДИ 1,1–7,5; $p < 0,03$) во внутренней когорте и ОР 3,7 (95 % ДИ 2,0–6,8; $p < 0,001$) во внешней когорте (валидация). Но 5-летняя БРВ была достоверно предсказана только для пациентов III стадии ($p < 0,001$; $n = 107$) Reliable stratification of patients according to survival HR 2.9 (95 % CI 1.1–7.5; $p < 0.03$) in the internal cohort and HR 3.7 (95 % CI 2.0–6.8; $p < 0.001$) in the external cohort (validation). But 5-year DFS was significantly predicted only for stage III patients ($p < 0.001$; $n = 107$)
Shu P. и соавт. [40] Shu P. et al. [40]	Несколько наборов данных ($n = 1273$) Several datasets ($n = 1273$)	<i>PRGPs (RPS6KA5, ITGA5, FSTL3, S100A2, PEX6, KRT17, GZMA, MBTD1, ZNF468, KLK10, MINPPI, BRIPI, ZNF184, RPS6KC1, GLMN, WWC3, C5orf30)</i>	Отделение пациентов с высоким риском рецидива от пациентов с низким риском по БРВ. Во внутренней когорте ОР 4,6 (95 % ДИ 2,55–8,32; $p < 0,001$), в валидационной ОР 4,09 (95 % ДИ 1,99–8,39; $p < 0,0001$) Allowed separation of patients at high risk of recurrence from those at low risk by DFS. In the internal cohort HR 4.6 (95 % CI 2.55–8.32; $p < 0.001$), in the validation cohort HR 4.09 (95 % CI 1.99–8.39; $p < 0.0001$)

Окончание таблицы
End of table

Автор, ссылка Author, source	Число пациентов, базы данных Number of patients, databases	Генная сигнатура Gene signature	Результат Result
Liang L. и соавт. [41] Liang L. et al. [41]	TCGA ($n = 438$, I–III стадий, равное количество левосторонней и правосторонней локализации) TCGA ($n = 438$, stages I–III, equal number of left-sided and right-sided localization)	<i>PHACTR3, CKMT2, CYP2W1, ERFE, HOXC4</i> – левосторонняя локализация, <i>EREG, ERFE, HOXC6, SLC22A31, TFF1, GF11, ZG16, RASL10B</i> – правосторонняя локализация <i>PHACTR3, CKMT2, CYP2W1, ERFE, HOXC4</i> – left-sided localization, <i>EREG, ERFE, HOXC6, SLC22A31, TFF1, GF11, ZG16, RASL10B</i> – right-sided localization	Сигнатуры генов показали достоверно различную выживаемость при лево- и правосторонней локализации, ОР для право- и левосторонней локализации составляли 3,530 (95 % ДИ 1,93–6,44; $p < 0,001$) и 2,04 (95 % ДИ 1,00–4,14; $p = 0,049$) соответственно Gene signatures showed significantly different survival rates for left-sided and right-sided localization, HR for right- and left-sided localization were 3.530 (95 % CI 1.93–6.44; $p < 0.001$) and 2.04 (95 % CI 1.00–4.14; $p = 0.049$) respectively
Yang W.-J. и соавт. [42] Yang W.-J. et al. [42]	TCGA (124 пациент только II стадии), валидация на GEO. TCGA (124 stage II patients only), validation at GEO	<i>ZNF561, WFS1, SLC2A1, PTGRI</i>	Разделение II стадии на высокий и низкий риск рецидива. Но у части пациентов с низким риском также наблюдался рецидив после операции. Значение AUC во внутренней когорте 0,882, в валидационной 0,943 Division of stage II into high and low risk of recurrence. But a part of low risk patients also had recurrence after surgery. AUC value in the internal cohort 0.882, in the validation cohort 0.943
Yuan Y. и соавт. [43] Yuan Y. et al. [43]	TCGA ($n = 231$) и GEO ($n = 573$), только I–II стадии. TCGA ($n = 231$) and GEO ($n = 573$), stages I–II only	<i>FOXD4, ENPEP, HOXC6, ALOX15B</i>	Более высокая экспрессия сигнатуры генов показала более высокие показатели 1, 3, 5-летней ОБ. Значения AUC составили 0,98; 0,85 и 0,86 соответственно Higher gene signature expression showed higher 1, 3, 5-year OS. The AUC values were 0.98; 0.85, and 0.86, respectively

Примечание. КРР – колоректальный рак, ОР – отношение рисков, ДИ – доверительный интервал, ОБ – общая выживаемость, БРВ – безрецидивная выживаемость.

Note. CRC – colorectal cancer, HR – hazard ratio, CI – confidence interval, OS – overall survival, DFS – disease-free survival.

маркеров в большинстве своем оказались безуспешными, поскольку основывались на механизме действия лекарственного препарата без учета того, что у опухоли имеется множество биологических характеристик.

Исследование D. Song и соавт., опубликованное в 2022 г., было первым, в котором изучена корреляция между ответом на медикаментозную терапию и моделью риска, основанной на генных сигнатурах. В этой работе также большинство пациентов были с не-мКРР (83,3 % из TCGA и 97 % из GEO с приблизительно сходным соотношением II и III стадий). В данном исследовании стремились выделить сигнатуру генов, связанную с репарацией ДНК (DRG), для прогнозирования ОБ пациентов с КРР. Дифференциально экспрессируемые DRG (DE-DRG) были проанализированы только на существующих базах данных (TCGA и GEO, $n = 396$ и 328 соответственно). Это обуславливает возможные ограничения данного

исследования, так как оно представляет собой биоинформатический анализ с возможными погрешностями ретроспективных данных. Для классификации пациентов в группы высокого и низкого риска была выделена следующая сигнатура DE-DRG: *ESCO2, AXIN2, PLK1, CDC25C, IGF1, TREX2, ALKBH2, ESR1* и *MC1R*. Структурно эти гены были изменены незначимо, основными изменениями были миссенс-мутации, то есть на экспрессию этих генов мутации не оказывали влияние. Авторы проанализировали чувствительность к химио- и таргетной терапии (всего 30 агентов) на основе сигнатуры DE-DRG и базы данных по чувствительности тех или иных клеточных линий к противоопухолевым препаратам. Результаты показали, что существует корреляция между экспрессией *ALKBH2*, *ESCO2* и *PLK1* и чувствительностью к нескольким лекарственным средствам. Например, экспрессия *ESCO2* коррелировала с потенциальной чувствительностью к цетуксимабу. Большинство ис-

следуемых агентов не имеют практического применения при КРР [46]. В аналогичной работе с сигнатурой генов репарации ДНК (*POLR2B*, *RAD1*, *CDA*, *NPR2*, *UBE2D2*, *BCL2*, *PLD6*, *ERBB2*, *ARPC1B*, *FUT4*, *PSME2*) пациентов также подразделяли на группы высокого и низкого риска. В группах высокого риска отмечалась значительно худшая ВБПБ, чем в группах низкого риска (ОР 2,12, 95 % ДИ 1,40–3,21; $p < 0,001$). С помощью набора данных геномики лекарственной чувствительности при раке (GDSC) авторы продемонстрировали, что среди химиотерапевтических препаратов, таких как оксалиплатин, 5-фторурацил и иринотекан, значения показателя 50 % ингибирующей концентрации препарата (IC50 для клеточной линии) в группе низкого риска были ниже [47].

Генные сигнатуры и функциональные пути

Использование экспрессионных и транскрипционных данных для ассоциации набора генов с изменением фенотипа открывает еще более богатый ресурс. Для этих методов применяется ряд биоинформатических методик, суть которых сводится к связи работы генов с их функциональной характеристикой, связи с метаболическими путями. Даже не используя непосредственные методики протеомики, фосфопротеомики и метаболомики, данные связи могут быть проведены при использовании баз данных. Однако в данном случае это будут базы данных другого характера, нежели описанные выше, то есть ассоциация генов и основных функциональных путей. В исследовании С. Li и соавт. среди 146 случаев КРР идентифицированы 3 консенсусных кластера (CCs) на основе протеомных данных. CCs имели разную вероятность БРВ и оставались независимым прогностическим фактором после поправки на стадию и предоперационное лечение ($p = 0,017$). Однако какие-либо достоверные различия наблюдались только среди пациентов с мКРР [48]. По-видимому, прогностическое значение экспрессионных данных нивелируется после введения дополнительных данных по экспрессируемым белкам. Возможно, новые молекулярно-генетические исследования покажут более совершенные данные корреляции «ген — белок», либо следует далее более скептически использовать существующие базы данных по ассоциации генов и функциональных путей, используемых в клинических исследованиях. Вероятно, в контексте выделения экспрессионных данных биологически более значимо выделять не корреляции «ген — белок», а корреляции «киназа — субстрат». Более интересные данные получены при изучении фосфопротеома. Всего обнаружено 1487 фосфозитов, на основе которых в каждом CC были идентифицированы субкластеры. Интересно, что фосфопротеомные данные отличали первичные опухоли из мКРР и не-мКРР в каждом

протеомном подтипе: SC1, SC3 и SC5 были характерны для мКРР, а SC2, SC4 и SC6 — не-мКРР. Основываясь на соотношениях «киназа — субстрат» из базы PhosphoSitePlus оценены киназа-субстратные корреляции. Обнаружены в основном отрицательные корреляции в SC1, SC3 и SC5, а в SC2 и SC4 — преимущественно положительные. SC6 характеризовался отрицательной регуляцией между киназами и субстратами, что позволяет предположить, что не-мКРР в CC3 был больше похож на мКРР по прогнозу [48].

В исследовании D. Lin и соавт. сравнивали базы данных, включающие 1142 пациента (87,4 % с не-мКРР) из GSE39582, GSE17537 и TCGA. В данном исследовании изучено 2923 гена, связанные с метаболизмом и участвующие в 117 метаболических путях. Функциональные характеристики генов и путей извлечены из базы данных молекулярных сигнатур (MSigDB). Авторы идентифицировали 2 подтипа: кластер А и кластер В. Обнаружено, что у пациентов в кластере В с большей вероятностью был подтип C4C6 (по CIT-классификации) и подтип CMS4. Анализ выживаемости показал, что кластер В связан с существенно более худшей ОВ, чем кластер А (ОР 2,05, ДИ 1,53–2,75; $p < 0,0001$). Аналогичное расхождение наблюдалось и по БРВ, но только у пациентов II и III стадии (ОР 1,69, 95 % ДИ 1,17–2,43; $p = 0,0044$). Авторы использовали набор данных GSE39582 для классификации пациентов на основе профилей экспрессии генов, затем попытались вывести так называемый метаболический рис и валидировать на GSE17537 и TCGA. Выделена следующая закономерность: высокая экспрессия *LIPG*, *PSME1*, *METTL2B*, *DDX52*, *CS*, *NHP2*, *POMT1*, *OGDHL*, *AMACR*, *ALOX12B* и *ACOX2* коррелировала с благоприятным прогнозом, тогда как высокая экспрессия *RPS25*, *CYP2D6*, *PLA2G4D*, *INHBB*, *NPR2*, *PLCE1*, *LIPG* и *ABCD4* — с плохим прогнозом. Пациенты группы высокого риска имели более короткую ОВ (ОР 3,45, 95 % ДИ 2,49–4,77; $p < 0,0001$), что подтверждалось при валидации и сохранялось независимо от стадии TNM (tumor, nodus и metastasis), лечения, MSI-статуса [49].

Заключение

Персонализация, безусловно, является закономерным и необходимым этапом развития. Существующая молекулярно-генетическая классификация не имеет значимого клинического применения. Необходимы новые прогностические факторы для более точного определения прогноза у пациентов с КРР. Более точным прогностическим маркером могут стать генные сигнатуры. В ряде исследований рассмотрена роль сигнатур для прогноза риска рецидива, БРВ и ОВ. Однако ввиду разрозненности данных, большого разнообразия исследуемых сигнатур сделать какие-то значимые выводы по их практическому

значению невозможно. Важным шагом к решению данной проблемы является использование не только методик WES, но и WTS, оценка протеома по мПНК. В данном обзоре представлена прогностическая значимость такого подхода. Кроме того, анализ экспрессии генов с использованием WES- и WTS-методик может иметь предиктивное значение и указывать на эффективность лекарственных опций лечения КРР, а также, что вероятно, на новые терапевтические подходы. Так, *in vitro* продемонстрирована корреляция риска на основе генных сигнатур, связанных с репарацией ДНК, и чувствительности к разным

терапевтическим агентам. Возможно, наибольшее практическое значение будут иметь не просто данные, полученные при WES/WTS, а также их ассоциация с метаболическими характеристиками. В исследованиях показано, что киназа-субстратные корреляции дополняют и уточняют данные секвенирования. В совокупности это может стать точным показателем прогноза КРР и ответа на лекарственное лечение. Применение генных сигнатур на сегодняшний момент не имеет практического применения, однако это является перспективным направлением в персонализации подходов к ведению пациентов с КРР.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Siegel R.L., Miller K.D., Sauer A.G. et al. Colorectal cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2020;70(3):145–64. DOI: 10.3322/caac.21601
2. Punt C.J.A., Koopman M., Vermeulen L. From tumor heterogeneity to advances in precision treatment of colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14(4):235–46. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.171
3. Sinkala M., Mulder N., Patrick Martin D. Metabolic gene alterations impact the clinical aggressiveness and drug responses of 32 human cancers. *Commun Biol* 2019;2(1):414. DOI: 10.1038/s42003-019-0666-1
4. Benson A.B., Venook A.P., Al-Hawary M.M. et al. Colon Cancer, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Version since 2.2021. *J Natl Compr Canc Netw* 2021;19(3):329–59. DOI: 10.6004/jnccn.2021.0012
5. Трякин А.А., Федянин М.Ю., Цуканов А.С. и др. Микросателлитная нестабильность как уникальная характеристика опухолей и предиктор эффективности иммунотерапии. *Злокачественные опухоли* 2019;9(4):59–69. DOI: 10.18027/2224-5057-2019-9-4-59-69
Tryakin A.A., Fedyanin M.Yu., Tsukanov A.S. et al. Microsatellite instability as a unique characteristic of tumors and a predictor of the response of immunotherapy. *Zlokachestvenny'e opukholi = Malignant Tumours* 2019;9(4):59–69. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2019-9-4-59-69
6. Федянин М.Ю., Игнатова Е.О., Трякин А.А. Молекулярно-генетические подтипы рака толстой кишки — прогресс или тупик? *Практическая онкология* 2021;22(1):72–86. DOI: 10.31917/2201072
Fedyanin M.Yu., Ignatova E.O., Tryakin A.A. Colorectal molecular subtypes — Progress or deadlock? *Prakticheskaya onkologiya = Practical oncology* 2021;22(1):72–86. (In Russ.). DOI: 10.31917/2201072
7. Hutchins G., Southward K., Handley K. et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2011;29(10):1261–70. DOI: 10.1200/JCO.2010.30.1366
8. Tran B., Kopetz S., Tie J. et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2011;117(20):4623–32. DOI: 10.1002/cncr.26086
9. Heinemann V., Stintzing S., Modest D.P. et al. Early tumour shrinkage (ETS) and depth of response (DpR) in the treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). *Eur J Cancer* 2015;51(14):1927–36. DOI: 10.1016/j.ejca.2015.06.116
10. Popovici V., Budinska E., Tejpar S. et al. Identification of a poor-prognosis BRAF mutant-like population of patients with colon cancer. *J Clin Oncol* 2012;30(12):1288–95. DOI: 10.1200/JCO.2011.39.5814
11. Takayuki Y., Jun W., Kohei Sh. et al. Panitumumab (PAN) plus mFOLFOX6 versus bevacizumab (BEV) plus mFOLFOX6 as first-line treatment in patients with RAS wild-type (WT) metastatic colorectal cancer (mCRC): Results from the phase 3 PARADIGM trial. *ASCO Annual Meeting II. Gastrointestinal Cancer — Colorectal and Anal. J Clin Oncol* 2022;40(Suppl. 17). DOI: 10.1200/JCO.2022.40.17_suppl.LBA1
12. Yamazaki K., Muro K., Watanabe J. et al. Efficacy of panitumumab in patients with left-sided disease, MSS/MSI-L, and RAS/BRAF WT: A biomarker study of the phase III PARADIGM trial. *ASCO Annual Meeting. Oral Abstract Session. Gastrointestinal Cancer — Colorectal and Anal. J Clin Oncol* 2023;41(Suppl. 16):3508.
13. Menter D.G., Davis J.S., Bradley M.B. et al. Back to the colorectal cancer consensus molecular subtype future. *Curr Gastroenterol Rep* 2019;21(2):5. DOI: 10.1007/s11894-019-0674-9
14. Guinney J., Dienstmann R., Wang X. et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015;21(11):1350–6. DOI: 10.1038/nm.3967
15. Dienstmann R., Vermeulen L., Guinney J. et al. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2017;17(2):79–92. DOI: 10.1038/nrc.2016.126
16. Okita A., Takahashi Sh., Ouchi K. et al. Consensus molecular subtypes classification of colorectal cancer as a predictive factor for chemotherapeutic efficacy against metastatic colorectal cancer. *Oncotarget* 2018;9(27):18698–711. DOI: 10.18632/oncotarget.24617
17. Kwon Y., Park M., Jang M. et al. Prognosis of stage III colorectal carcinomas with FOLFOX adjuvant chemotherapy can be predicted by molecular subtype. *Oncotarget* 2017;8(24):39367–81. DOI: 10.18632/oncotarget.17023
18. Song N., Pogue-Geile K.L., Gavin P.G. et al. Clinical outcome from oxaliplatin treatment in stage II/III colon cancer according to intrinsic subtypes: Secondary analysis of NSABP C-07/NRG oncology randomized clinical trial. *JAMA Oncol* 2016;2(9):1162–9. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.2314
19. Allen W.L., Dunne P.D., McDade S. et al. Transcriptional subtyping and CD8 immunohistochemistry identifies poor prognosis stage II/III colorectal cancer patients who benefit from

- adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol Precis Oncol* 2018;(2): 1–13. DOI: 10.1200/PO.17.00241
20. Li Y., Yao Q., Zhang L. et al. Immunohistochemistry-based consensus molecular subtypes as a prognostic and predictive biomarker for adjuvant chemotherapy in patients with stage II colorectal cancer. *Oncologist* 2020;25(12):1968–79. DOI: 10.1002/ONCO.13521
 21. Pogue-Geile K.L., Andre T., Song N. et al. Association of colon cancer (CC) molecular signatures with prognosis and oxaliplatin prediction-benefit in the MOSAIC Trial (Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-FU-LV in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer). *J Clin Oncol* 2019;37(Suppl. 15):3503. DOI: 10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.3503
 22. Dunne P.D., Alderdice M., O'Reilly P.G. et al. Cancer-cell intrinsic gene expression signatures overcome intratumoural heterogeneity bias in colorectal cancer patient classification. *Nat Commun* 2017;8:15657. DOI: 10.1038/ncomms15657
 23. Piskol R., Huw L., Sergin I. et al. A clinically applicable gene-expression classifier reveals intrinsic and extrinsic contributions to consensus molecular subtypes in primary and metastatic colon cancer. *Clin Cancer Res* 2019;25(14):4431–42. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3032
 24. Grothey A., Tabernero J., Arnold D. et al. Fluoropyrimidine (FP) + bevacizumab (BEV) + atezolizumab vs FP/BEV in BRAFwt metastatic colorectal cancer (mCRC): Findings from Cohort 2 of MODUL – A multicentre, randomized trial of biomarker-driven maintenance treatment following first-line induction therapy. *Ann Oncol* 2018;29(8):714–5. DOI: 10.1093/annonc/mdy424.020
 25. Itatani Y., Kawada K., Yamamoto T. et al. Resistance to anti-angiogenic therapy in cancer-alterations to anti-VEGF pathway. *Int J Mol Sci* 2018;19(4):1232. DOI: 10.3390/ijms19041232
 26. Borelli B., Fontana E., Giordano M. et al. Prognostic and predictive impact of consensus molecular subtypes and CRCAssigner classifications in metastatic colorectal cancer: a translational analysis of the TRIBE2 study. *ESMO Open* 2021;6(2):100073. DOI: 10.1016/j.esmoop.2021.100073
 27. Prehn J., Kisakol B., Matveeva A. et al. Rectal cancer-specific subtyping using transcriptomics datasets derived from treatment-naïve patients to assess novel prognostic signatures and key differences to CMS-based subtyping. *ASCO Meeting Abstract. Gastrointestinal Cancers Symposium. J Clin Oncol* 2023;41(Suppl. 4):235. DOI: 10.1200/JCO.2023.41.4_suppl.235
 28. Wang Z., Jensen M.A., Zenklusen J.C. A practical guide to The Cancer Genome Atlas (TCGA). *Methods Mol Biol* 2016;1418:111–41. DOI: 10.1007/978-1-4939-3578-9_6
 29. Kopetz S., Tabernero J., Rosenberg R. et al. Genomic classifier ColoPrint predicts recurrence in stage II colorectal cancer patients more accurately than clinical factors. *Oncologist* 2015;20(2):127–33. DOI: 10.1634/theoncologist.2014-0325
 30. Brenner B., Shulman Y., Hubert A. et al. Treatments and clinical outcomes in stage II colon cancer (CC) patients (pts) with 12-gene Oncotype DX Colon Recurrence Score assay-guided therapy: Real-world data. *ASCO Annual Meeting. Gastrointestinal Cancer – Colorectal and Anal. J Clin Oncol* 2023;41(Suppl. 16): 3620. DOI: 10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.3620
 31. Li Y., He M., Yaoyao Zh. et al. The prognostic and clinicopathological roles of PD-L1 expression in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Front Pharmacol* 2019;10:139. DOI: 10.3389/fphar.2019.00139
 32. Pan J., Zhou H., Cooper L. et al. LAYN is a prognostic biomarker and correlated with immune infiltrates in gastric and colon cancers. *Front Immunol* 2019;10:6. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00006
 33. Zhang C., Chen Sh., Ma X. et al. Upregulation of STC2 in colorectal cancer and its clinicopathological significance. *Oncotargets Ther* 2019;12:1249–58. DOI: 10.2147/OTT.S191609
 34. Ershov P., Poyarkov S., Konstantinova Y. et al. Transcriptomic signatures in colorectal cancer progression. *Curr Mol Med* 2023;23(3):239–49. DOI: 10.2174/1566524022666220427102048
 35. Ahluwalia P., Mondal A.K., Bloomer Ch. et al. Identification and clinical validation of a novel 4 gene-signature with prognostic utility in colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 2019;20(15):3818. DOI: 10.3390/ijms20153818
 36. Chang W., Gao X., Han Y. et al. Gene expression profiling-derived immunohistochemistry signature with high prognostic value in colorectal carcinoma. *Gut* 2014;63(9):1457–67. DOI: 10.1136/gutjnl-2013-305475
 37. Dong C., Cui D., Liu G. et al. Cancer stem cell associated eight gene-based signature predicts clinical outcomes of colorectal cancer. *Oncol Lett* 2019;17(1):442–9. DOI: 10.3892/ol.2018.9533
 38. Hong J., Wu X., Fang W. et al. A five-gene signature for predicting the prognosis of colorectal cancer. *Curr Gene Ther* 2021;21(4):280–9. DOI: 10.2174/1566523220666201012151803
 39. Sveen A., Agesen T.H., Nesbakken A. et al. ColoGuidePro: A prognostic 7-gene expression signature for stage III colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2012;18(21):6001–10. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3302
 40. Shu P., Wu J., Tong Y. et al. Gene pair based prognostic signature for colorectal colon cancer. *Medicine (Baltimore)* 2018;97(42):e12788. DOI: 10.1097/MD.00000000000012788
 41. Liang L., Zeng J.H., Qin X.G. et al. Distinguishable prognostic signatures of left- and right-sided colon cancer: A study based on sequencing data. *Cell Physiol Biochem* 2018;48(2):475–90. DOI: 10.1159/000491778
 42. Yang W.J., Wang H.B., Wang W.D. et al. A network-based predictive gene expression signature for recurrence risks in stage II colorectal cancer. *Cancer Med* 2020;(1): 179–93. DOI: 10.1002/cam4.2642
 43. Yuan Y., Chen J., Wang J. et al. Development and clinical validation of a novel 4-gene prognostic signature predicting survival in colorectal cancer. *Front Oncol* 2020;10:595. DOI: 10.3389/fonc.2020.00595
 44. Lu X., Xiao Sh., Jin C. et al. ERCC1 and XPD/ERCC2 polymorphisms' predictive value of oxaliplatin-based chemotherapies in advanced colorectal cancer has an ethnic discrepancy: A meta-analysis. *J Clin Lab Anal* 2012;26(1):10–5. DOI: 10.1002/jcla.20494
 45. Smorenburg C.H., Peters G.J., Groeninger C.J. et al. Phase II study of tailored chemotherapy for advanced colorectal cancer with either 5-fluorouracil and leucovorin or oxaliplatin and irinotecan based on the expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase. *Ann Oncol* 2006;17(1):35–42. DOI: 10.1093/annonc/mdj046
 46. Song D., Zhang D., Chen S. et al. Identification and validation of prognosis-associated DNA repair gene signatures in colorectal cancer. *Sci Rep* 2022;12(1):6946. DOI: 10.1038/s41598-022-10561-w
 47. Lv M.Y., Wang W., Zhong M. et al. DNA repair-related gene signature in predicting prognosis of colorectal cancer patients. *Front Genet* 2022;13:872238. DOI: 10.3389/fgene.2022.872238
 48. Li C., Sun Y., Yu G. et al. Integrated omics of metastatic colorectal cancer. *Cancer Cell* 2020;38(5):734–47. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.08.002
 49. Lin D., Fan W., Zhang R. et al. Molecular subtype identification and prognosis stratification by a metabolism-related gene expression signature in colorectal cancer. *J Transl Med* 2021;19(1):279. DOI: 10.1186/s12967-021-02952-w

Вклад авторов

Г.Г. Макиев: разработка дизайна обзора, сбор и анализ данных литературы, написание и редактирование текста статьи;
М.Ю. Федянин, Е.О. Игнатова, О.А. Кузнецова, Я.Е. Чихарева: сбор и анализ данных литературы, редактирование текста статьи;
А.А. Трякин: разработка концепции, сбор и анализ данных литературы, редактирование текста статьи.

Author's contributions

G.G. Makiev: review design development, collection and analysis of literature data, writing and editing the text of the article;
M.Yu. Fedyanin, E.O. Ignatova, O.A. Kuznetsova, Ya.E. Chikhareva: collection and analysis of literature data, editing the text of the article;
A.A. Tryakin: concept development, collection and analysis of literature data, editing of the text of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

Г.Г. Макиев / G.G. Makiev: <https://orcid.org/0000-0001-9732-4033>
М.Ю. Федянин / M.Yu. Fedyanin: <https://orcid.org/0000-0001-5615-7806>
Е.О. Игнатова / E.O. Ignatova: <https://orcid.org/0000-0002-8114-7885>
О.А. Кузнецова / O.A. Kuznetsova: <https://orcid.org/0000-0001-7753-3081>
Я.Е. Чихарева / Ya.E. Chikhareva: <https://orcid.org/0009-0009-6649-9856>
А.А. Трякин / A.A. Tryakin: <https://orcid.org/0000-0003-2245-214X>

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 17.07.2023. Принята в печать: 26.02.2024.

Article received: 17.07.2023. Accepted for publication: 26.02.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-36-46>

Иммуноконъюгаты как препараты таргетной онкотерапии

С.Д. Щеглов*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24***Контакты:** Степан Дмитриевич Щеглов stepanshcegllov@mail.ru

Химиотерапия онкологических заболеваний сопряжена со значительным риском развития тяжелых побочных эффектов вследствие воздействия цитостатиков на здоровые клетки организма. Таргетная онкотерапия представляет собой инновационный подход к лечению онкологических заболеваний, направленный на специфические белковые структуры и метаболические пути, с высокой долей вероятности присущие опухолевым клеткам. Исторически одними из первых препаратов таргетной терапии, наряду с моноклональными антителами, были апробированы и в дальнейшем одобрены для клинического применения иммуноконъюгаты (ИК). Традиционно ИК описывается как ковалентно связанное с терапевтическим компонентом через линкер моноклональное антитело. За счет векторного компонента данные препараты позволяют применять избирательное воздействие на определенные эпитопы мишени, что значительно повышает терапевтический индекс высокотоксичных противоопухолевых средств. В дополнение к этому таргетная терапия способствует преодолению лекарственной устойчивости опухолей и улучшению прогноза заболевания. При этом фармацевтическая разработка ИК требует всестороннего учета специфических аспектов, таких как физико-химические свойства конъюгируемого вещества, оптимальный выбор изотипа иммуноглобулина класса G, биохимические свойства линкера и методы конъюгации. Всестороннее исследование этих аспектов позволит не только оптимизировать дизайн ИК, но и будет способствовать широкому распространению в клинической практике и расширению спектра применения подобных препаратов. В данном обзоре представлена эволюция концепции «конъюгат антитело – лекарственное средство» в рамках применения данных препаратов в онкотерапии. Рассматриваются и обобщаются также базовые для дизайна ИК аспекты строения и особенности стратегий конъюгации лекарственного вещества с моноклональным антителом.

Ключевые слова: иммуноконъюгат, таргетная терапия, онкология, моноклональное антитело, линкер**Для цитирования:** Щеглов С.Д. Иммуноконъюгаты как препараты таргетной онкотерапии. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(2):36–46.DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-36-46>

Immunoconjugates as drugs of targeted oncotherapy

Stepan D. Shcegllov*N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia***Contacts:** Stepan Dmitrievich Shcegllov stepanshcegllov@mail.ru

Chemotherapy for cancer is associated with a significant risk of severe side effects due to the effects of cytostatics on healthy cells. Targeted oncotherapy is an innovative approach to cancer treatment that targets specific protein structures and metabolic pathways that are highly likely to be inherent in tumor cells. Historically, immunoconjugates (IC) were among the first targeted therapy agents, along with monoclonal antibodies, to be approbated and subsequently approved for clinical use. Traditionally, an IC is described as a monoclonal antibody covalently linked to a therapeutic component via a linker. Due to their vector component, these drugs allow the application of selective effects on epitope-defined targets, which significantly increases the therapeutic index of highly toxic anti-tumor agents. In addition, targeting therapy helps to overcome drug resistance of tumors and improve the prognosis of the disease. Herewith, the pharmaceutical design of IC requires comprehensive consideration of specific

aspects such as physicochemical properties of the conjugated substance, optimal choice of immunoglobulin class G isotype, biochemical properties of the linker and conjugation methods. A comprehensive study of these aspects will not only optimize the design of IC, but will also contribute to the widespread use in clinical practice and expand the range of applications of such drugs. This review presents the evolution of the antibody – drug conjugate concept in the context of the application of these drugs in oncotherapy. The aspects of structure and specific features of strategies of drug-drug conjugation with monoclonal antibody, which are basic for IC design, are also discussed and summarized.

Keywords: immunoconjugate, targeted therapy, oncology, monoclonal antibody, linker

For citation: Shceglov S.D. Immunoconjugates as drugs of targeted oncotherapy. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(2):36–46. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-36-46>

Введение

В настоящее время сохраняется опасная тенденция к росту онкологических заболеваний во всем мире. Так, прогнозируется, что к 2050 г. количество нововыявленных случаев злокачественных новообразований достигнет 35 млн [1].

Сложившаяся вследствие различных экологических и социальных причин неблагоприятная динамика диктует особые требования к повышению эффективности лечения онкологических заболеваний. Традиционная химиотерапия сопряжена с риском нежелательных явлений при системном введении цитостатиков. Механизм действия подобных химиотерапевтических агентов реализуется в отношении как патологических, так и интактных клеток организма, тем самым способствуя развитию побочных эффектов у подавляющего большинства пациентов. При этом общий вклад традиционной химиотерапии в выживаемость пациента может оставаться невысоким, что дополнительно свидетельствует о недостаточной специфичности подобных лекарственных препаратов в отношении опухолей [2, 3].

Преодолеть неспецифическое действие цитостатиков на здоровые ткани организма, тем самым способствуя сглаживанию терапевтического профиля токсичных молекул с одновременным повышением эффективности терапии, становится возможным благодаря применению таргетной (адресной) доставки биологически активных веществ непосредственно к раковым клеткам. Путем нацеливания моноклональных антител (МкАТ) и антител (АТ) соответственно, эпитопами которых являются сверхэкспрессируемые специфические структуры опухолевой клетки, удалось реализовать данную стратегию онкотерапии, способствуя снижению тяжести побочных эффектов. Однако использование только МкАТ может быть недостаточным вследствие их меньшей, по сравнению с нецелевыми препаратами, летальности в отношении раковых клеток. Альтернативой, позволяющей сохранить специфическое действие в отношении патологических клеток, стали иммуноконъюгаты (ИК) – соединения, представляющие собой АТ, ковалентно связанные

(конъюгированные) с молекулой цитостатика. С момента разработки гибридной технологии в 1975 г. и по настоящий момент наблюдается стойкий интерес к данным лекарственным препаратам [3–5].

Эволюция препаратов конъюгат – моноклональное антитело

С зарождения идеи целенаправленного транспорта цитотоксических молекул прошло уже более века. Еще до создания гибридной технологии Ж. Кёлером и С. Мильштейном предпринимались попытки претворения в жизнь концепции «волшебной пули» П. Эрлиха путем ковалентного и нековалентного связывания различных противоопухолевых агентов с γ -глобулинами. С появлением технологии получения МкАТ, связывающих 1 эпитоп экспрессируемого опухолью антигена, вектор исследований сместился на получение высокоселективных препаратов, насчитывающих сегодня 3 поколения [4, 6, 7].

Первое поколение ИК представляет собой МкАТ, ковалентно связанные с молекулой цитостатика. На ранней стадии разработки таких препаратов считалась достаточной простая конъюгация посредством амидных связей противоопухолевых препаратов с АТ. Полученные АТ, содержащие до 8 молекул лекарственного средства, в большинстве своем были менее эффективны, чем неконъюгированные препараты. Опосредованное связывание АТ с цитостатиками через макромолекулярный носитель, линкер, приводило к образованию ИК с неудовлетворительной фармакокинетикой. Помимо этого, такие препараты вызывали иммунный ответ на АТ мышиноного происхождения. Использование гуманизированных АТ, на 95 % состоящих из иммуноглобулина (Ig) человека, и линкеров, расщепляющихся под действием лизосомальных ферментов опухоли, способствовало совокупному повышению эффективности и безопасности ИК. Примерами таких препаратов являются гемтузумаб озогамидин и инотузумаб озогамидин, в которых цитотоксическим компонентом является производное калихеамицина, расщепляющее двойную цепочку ДНК. Однако данные препараты имеют

ряд недостатков. Обнаружилось, что физиологические условия способствуют медленному гидролизу линкера, что приводит к нецелевой токсичности препарата. Помимо этого, вследствие гидрофобности производное калихеамицина вызывает агрегацию АТ, что способствует увеличению клиренса и иммуногенности препарата. ИК 1-го поколения характеризуется высокой неоднородностью продукта, поскольку его получение основано на беспорядочном присоединении через остатки лизина и цистеина, в результате чего АТ связывает разное количество цитостатика. Таким образом, препараты 1-го поколения не являются совершенными для таргетной онкотерапии и требуют дальнейшей модификации [4, 8–10].

Разработка 2-го поколения ИК была сопряжена с необходимостью оптимизации как таргетного компонента, так и цитотоксической полезной нагрузки с линкером. Использование изотипа МкАТ IgG1 продиктовано его благоприятными технологическими характеристиками, а также его высокой способностью нацеливаться на антиген опухолевых клеток, по сравнению с IgG4 препаратов 1-го поколения. В дополнение были обобщены требования к цитотоксическим веществам, такие как активность в субнаномолярных концентрациях, приемлемая растворимость в воде и стабильность в водных растворах. Подходящими кандидатами на роль полезной нагрузки стали ауристатины и майтанзиноиды. Улучшение линкеров позволило добиться стабильности ИК в системном кровотоке. Однако используемые методы конъюгации по-прежнему не решили проблему гетерогенности и опосредованной высокой нагрузкой АТ агрегации препаратов [4, 11, 12].

Эксперименты с нагрузкой АТ позволили определить оптимальное значение параметра DAR (drug-to-antibody ratio – соотношение «лекарство к АТ») ИК. Выяснилось, что снижение лекарственной нагрузки с 8 до 4 молекул на АТ способствует улучшению переносимости препарата, и, хотя активность *in vitro* кратно снижалась, конъюгаты с 4 молекулами цитостатика демонстрируют более высокую экспозицию дозы *in vivo*, тем самым компенсируя сниженную активность. Благодаря внедрению технологии сайт-специфичной конъюгации были получены препараты 3-го поколения, характеризующиеся высокой степенью гомогенности. Для конъюгации предлагаются более эффективные вещества, в частности тубулины, ингибирующие полимеризацию микротрубочек, или пирролобензодиазепины, избирательно связывающиеся с малой бороздкой ДНК. Весьма перспективны вещества-иммуномодуляторы. Оптимизация линкеров ИК 3-го поколения заключается в повышении их гидрофильности, например включением полиэтиленгликолевых (ПЭГ) фрагментов. Подобным образом удастся «солюбилизовать»

относительно гидрофобную молекулу, что в итоге препятствует агрегации конъюгатов. В совокупности препараты 3-го поколения обладают более высокой противоопухолевой активностью, но меньшей токсичностью, тем самым способствуя повышению эффективности онкотерапии [4, 13, 14].

В настоящий момент фармацевтический рынок содержит 15 наименований препаратов-ИК для онкотерапии (табл. 1), 7 из них зарегистрированы в Российской Федерации.

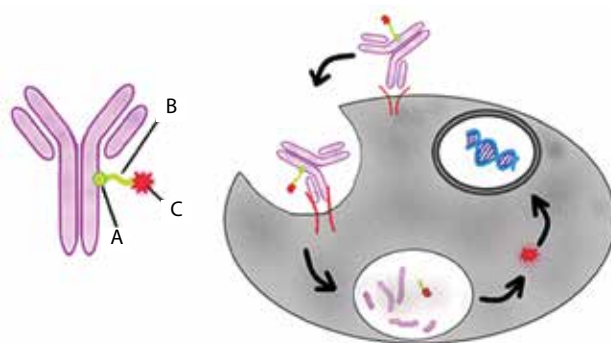
Общий дизайн иммуноконъюгатов

Строение ИК описывается как соединенный с МкАТ посредством химического линкера мощный цитостатический агент [4].

После введения препарата в кровоток таргетный компонент – АТ – распознает и связывается с поверхностными высокоэкспрессируемыми антигенами опухолевых клеток. После интернализации комплекс «конъюгат – рецептор» подвергается лизосомальной деструкции, тем самым высвобождая цитотоксическую полезную нагрузку в биоактивной форме внутри клетки [31]. Следовательно, подобная высокоорганизованная структура ИК требует учета ряда аспектов при фармацевтической разработке. Общий механизм действия данных препаратов представлен на рисунке.

Моноклональное антитело

Одной из первых проблем, возникших в процессе исторического развития данных препаратов, является их иммуногенность, связанная с использованием животного белка. В связи с этим были внедрены биоинженерные методы, давшие возможность получения АТ с аминокислотной последовательностью, на 90–95 % соответствующей человеческой. В дополнение к этому обогащалась методическая база, помогающая исследователям в определении иммуногенности будущих соединений. Так, в настоящее



Общее строение и механизм действия иммуноконъюгатов: А – сайт конъюгации линкера с антителом, В – линкер, С – цитостатический агент

The general structure and mechanism of action of immunoconjugates: A – site of conjugation of linker with antibody, B – linker, C – cytostatic agent

Таблица 1. Одобренные для применения препараты
Table 1. Approved drugs

МНН INN	Торговое наименование Trade name	Антитело Antibody	Линкер Linker	Цитостатик Cytostatic	Показания к применению Indications for use	Ссылка Reference
Гемтузумаб озогамин Gemtuzumab ozogamycin	Милотарг® Mylotarg	Анти-CD33 IgG4 Anti-CD33 IgG4	pH-чувствительный pH-sensitive	Калихеамицин Calicheamicin	CD33 ⁺ острый миелоидный лейкоз CD33 ⁺ acute myeloid leukemia	[15–17]
Брентуксимаб ведотин Brentuximab vedotin	Адцетрис® Adcetris	Анти-CD30 IgG1 Anti-CD30 IgG1	Пептидный Peptide	Монометил ауристатин E (MMAE) Monomethyl auristatin E (MMAE)	CD30 ⁺ лимфомы (анapластическая крупноклеточная лимфома, лимфома Ходжкина) CD30 ⁺ lymphomas (anaplastic large-cell lymphoma, Hodgkin lymphoma)	[15, 16, 18]
Трастузумаб эмтанзин Trastuzumab emtansine	Кадсила® Kadcyla	Анти-HER2 IgG1 Anti-HER2 IgG1	Нерасщепляемый тиоэфир (SMCC) Non-cleavable thioester (SMCC)	Мертансин (DM1) Mertansine (DM1)	HER2 ⁺ рак молочной железы HER2 ⁺ breast cancer	[16, 19]
Инотузумаб озогамин Inotuzumab ozogamicin	Биспонса Besponsa	Анти-CD22 IgG4 Anti-CD22 IgG4	pH-чувствительный pH-sensitive	Калихеамицин Calicheamicin	CD22 ⁺ В-клеточный острый лимфобластный лейкоз CD22 ⁺ B-cell acute lymphoblastic leukemia	[15, 16, 20]
Моксетумомаб пасудотокс Moxetumomab pasudotox	Lumoxiti	Анти-CD22 scFv Anti-CD22 scFv	Рекомбинантный пептидный Recombinant peptide	PE38 (фрагмент экзотоксина синегнойной палочки) PE38 (<i>Pseudomonas</i> exotoxin fragment)	CD22 ⁺ волосатоклеточный лейкоз CD22 ⁺ hairy cell leukemia	[16, 21]
Полатузумаб ведотин Polatuzumab vedotin	Полайви® Polivy	Анти-CD79b IgG1 Anti-CD79b IgG1	Пептидный Peptide	Монометил ауристатин E (MMAE) Monomethyl auristatin E (MMAE)	Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома Diffuse large B-cell lymphoma	[15, 16]
Энфортумаб ведотин Enfortumab vedotin	Падцев Онко Padcev Onko	Анти-нектин-4 IgG1 Anti-nectin-4 IgG1	Пептидный Peptide	Монометил ауристатин E (MMAE) Monomethyl auristatin E (MMAE)	Уротелиальный рак Urothelial cancer	[16, 22]
Трастузумаб дерукстекан Trastuzumab deruxtecan	Энхерту Enhertu	Анти-HER2 IgG1 Anti-HER2 IgG1	Нерасщепляемый Non-cleavable	Дерукстекан Deruxtecan	HER2 ⁺ рак молочной железы и желудка HER2 ⁺ breast cancer and gastric cancer	[16, 23]
Сацигузумаб говитекан Sacituzumab govitecan	Trodelyv	Анти-Троп-2 IgG1 Anti-Trop-2 IgG1	pH-чувствительный pH-sensitive	SN-38 (говитекан) SN-38 (govitecan)	Трижды негативный рак молочной железы, уротелиальный рак Triple-negative breast cancer, urothelial cancer	[16, 24]

Окончание табл. 1
End of table 1

МНН INN	Торговое наименование Trade name	Антитело Antibody	Линкер Linker	Цитостатик Cytostatic	Показания к применению Indications for use	Ссылка Reference
Белантамаб мафодотин Belantamab mafodotin	Blenrep	Анти-BCMA IgG1 Anti-BCMA IgG1	Нерасщепляемый (малеимидокаприловый) Non-cleavable (maleidocaproyl)	Монометил ауристатин F (MMAE) Monomethyl auristatin F (MMAE)	Множественная миелома Multiple myeloma	[16, 25]
Цетуксимаб сароталокан Cetuximab sarotalocan	Akalux	Анти-EGFR IgG1 Anti-EGFR IgG1	Нерасщепляемый Non-cleavable	IR700 (кремний-содержащий фталоцианин) IR700 (silicon phthalocyanine)	Рак головы и шеи (фотодинамическая терапия) Head and neck cancer (photodynamic therapy)	[16, 26]
Лонкастуксимаб тесирин Loncastuximab tesirine	Zynlonta	Анти-CD19 IgG1 Anti-CD19 IgG1	ПЭГилированный пептидный PEGylated peptide	SG3199 (производное пирролобензодиазепина) SG3199 (pyrrolbenzodiazepine derivative)	Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома Diffuse large B-cell lymphoma	[16, 27]
Диситамаб Ведотин Disitamab Vedotin	Aidixi	Анти-HER2 IgG1 Anti-HER2 IgG1	Пептидный Peptide	Монометил ауристатин E (MMAE) Monomethyl auristatin E (MMAE)	HER2 ⁺ уротелиальный рак, HER2 ⁺ рак желудка/гастроэзофагеального перехода HER2 ⁺ urothelial cancer, HER2 ⁺ gastric cancer/gastro esophageal junction cancer	[16, 28]
Тизотумаб ведотин Tisotumab vedotin	Tivdak	Анти-TF-011 IgG1 Anti-TF-011 IgG1	Пептидный Peptide	Монометил ауристатин E (MMAE) Monomethyl auristatin E (MMAE)	Рецидивирующий или метастатический рак шейки матки Recurrent or metastatic cervical cancer	[16, 29]
Мирветуксимаб соравтансин Mirvetuximab soravtansine	Elahere	Анти-FRa IgG1 Anti-FRa IgG1	Расщепляемый (сульфинированный глутатион-чувствительный) Cleavable (sulfinated glutathione-sensitive)	Равтансин (DM4) Ravtansine (DM4)	FRa ⁺ платинорезистентный эпителиальный рак яичников, фаллопиевых труб, первичный рак брюшины FRa ⁺ platinum resistant epithelial ovarian, fallopian tube, primary peritoneal cancer	[16, 30]

Примечание. МНН — международное непатентованное наименование.

Note. INN — international nonproprietary name.

время в рамках межотраслевого консорциума создается единая база данных иммуногенности, призванная облегчить разработку подобных биотерапевтических препаратов [32, 33].

Другим аспектом оптимизации адресного компонента является выбор изотипа IgG. Наиболее распространенным изотипом, используемым при разработке ИК, является IgG1, специально подобранный исходя из эффекторных функций Fc-фрагмента АТ для реализации АТ-зависимой клеточной цитотоксичности данных препаратов. Однако подобный эффект может оказывать влияние на терапевтический индекс лекарственного препарата. Так, в случае трастузумаба эмтанзина описывается дозозависимая тромбоцитопения, опосредованная Fc-фрагментом АТ, связывающимся с рецепторами (FcR1a) мегакариоцитов, что в конечном итоге приводит к высвобождению цитостатика и угнетению пролиферации тромбоцитов [32, 34].

Изотип IgG2 имеет теоретический потенциал для большей цитостатической нагрузки, обусловленной четырьмя дисульфидными мостиками как сайтами конъюгации, против двух у IgG1. Однако IgG2 менее эффективен в способности индуцировать АТ-зависимую клеточную цитотоксичность. Изотип IgG3 имеет неудовлетворительные фармакокинетические показатели, обусловленные ускоренным протеолизом удлиненной шарнирной области. АТ IgG4, используемые для создания ранних клинически одобренных ИК, в настоящее время являются перспективными для получения гибридных биспецифичных соединений, позволяющих связывать сразу 2 антигена опухолевой клетки, препятствуя развитию резистентности к терапии. Помимо этого, использование IgG4 целесообразно, когда Fc-опосредованные эффекты нежелательны, например, при нацеливании на белки PD-1 при конструировании ингибиторов контрольных точек иммунитета. Таким образом, выбор оптимального изотипа МкАТ первоочередно определяется необходимостью эффекта Fc-фрагмента [11, 32].

Линкер

Молекулярная структура линкера, ковалентно связывающего цитотоксическую полезную нагрузку с АТ, является критическим параметром, определяющим фармакокинетические и фармакодинамические свойства будущего ИК. Прежде всего линкер должен обладать достаточной стабильностью в плазме крови для минимизации системной токсичности, опосредованной преждевременной деструкцией конъюгата. В то же время линкер должен быстро расщепляться и высвобождать цитостатик, как только препарат был захвачен опухолевой клеткой. В зависимости от метаболического процесса в клетках

в большинстве ИК используются 2 типа линкеров: нерасщепляемые и расщепляемые [4, 31].

Нерасщепляемые линкеры, содержащие тиоэфирную или малеимидокаприловую группы, инертны к химическим или ферментативным средам *in vivo*; ИК при попадании в лизосому высвобождает лекарственное средство, ковалентно связанное через линкер с аминокислотным остатком метаболизированного АТ. Такой линкер, как правило, препятствует возникновению так называемого байстендорного эффекта (bystander effect), при котором лекарственное средство диффундирует из целевой клетки и убивает соседние, что может быть полезно в терапии гематологических видов рака [4, 35].

Расщепляемые линкеры используют биохимическое различие между системным кровотоком и микроокружением опухолевых клеток с их клеточным метаболизмом. Подобные линкеры дополнительно можно разделить на химически и ферментативно-расщепляемые. Химически расщепляемые линкеры высвобождают цитостатическую полезную нагрузку в ответ на снижение pH (кислотно-чувствительные) или на нуклеофильную атаку тиолов, таких как глутатион. Некоторые из одобренных ИК содержат линкеры на основе пептидов, чувствительных к лизосомальной протеазе — катепсину В. Кроме того, обнаружилось, что подобные линкеры отличаются высокой стабильностью в системном кровотоке благодаря наличию плазменных ингибиторов протеаз [4, 35, 36].

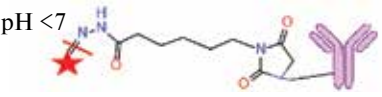
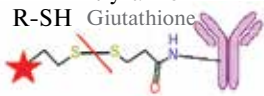
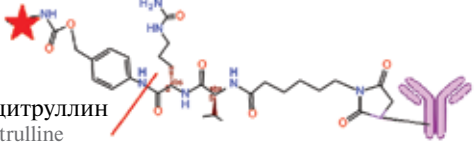
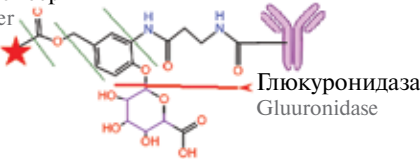
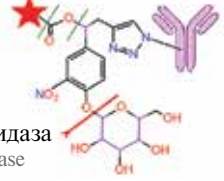
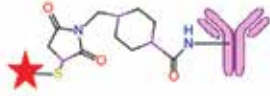
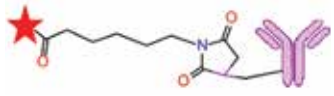
В дополнение к программируемой лабильности линкер должен обладать оптимальной гидрофильностью, препятствующей агрегации АТ. Данная проблема решается путем введения в структуру линкеров сульфонатных, диэфирных и ПЭГилированных групп [31].

Основные виды линкеров ИК представлены в табл. 2.

Цитотоксическая полезная нагрузка

Природа конъюгируемого цитотоксического агента имеет большое значение, поскольку механизм его действия будет определять общую стратегию терапии. Ранние разработки ИК, содержащие традиционные химиотерапевтические средства, не обладали достаточной эффективностью, поскольку их полезные нагрузки были недостаточно мощными. Ограниченная локализация АТ на опухолевой клетке, низкая экспрессия антигена и неэффективная интернализация могут привести к очень низким концентрациям лекарственного вещества в клетке. Следовательно, полезная нагрузка должна быть чрезвычайно токсичной, то есть с IC_{50} , приближающейся к субнанолярным значениям. Помимо этого подобное вещество должно быть небольшим по размеру, обладать приемлемой растворимостью в водных буферных

Таблица 2. Основные линкеры иммуноконъюгатов
Table 2. Main linkers of immunoconjugates

Группа линкеров Group of linkers	Подгруппа Subgroup	Пример структуры Example of structure	Ссылка Reference
Расщепляемые Cleavable	рН-чувствительные линкеры pH-sensitive linkers	pH < 7 	[15, 37]
	Восстанавливаемые линкеры Reducible linkers	Глутатион R-SH Glutathione 	[15, 38]
	Пептидные линкеры Peptide linkers	Валин-цитруллин Valine-Citrulline 	[15, 39]
	Расщепляемые глюкуронидазой линкеры Glucuronidase cleavable linkers	Распадаемый спейсер Disintegrating spacer 	[15]
	Расщепляемые галактозидазой линкеры Galactosidase cleavable linkers		[15, 40]
Нерасщепляемые Non-cleavable	Тиоэфирные линкеры Thioether linkers		[15, 41]
	Малеимидакаприловые линкеры Maleimidocaproyl linkers		[15, 41]

растворах для облегчения конъюгации с АТ, а также быть достаточно стабильным в плазме крови, учитывая длительный период полувыведения препаратов на основе МкАТ [42, 43]. Различные варианты полезной нагрузки АТ представлены в табл. 3.

Методы конъюгации

Немаловажным аспектом, определяющим конечную структуру и биофармацевтические свойства препарата, является способ конъюгации полезной нагрузки с МкАТ. В зависимости от выбранного метода реакционная смесь содержит ИК с переменным значением DAR. Поскольку полезная нагрузка часто имеет гидрофобную природу, повышение DAR может снижать стабильность препарата, но улучшать его

эффективность *in vitro*. При этом подобный ИК будет обладать более низким значением периода полувыведения, для чего придется применять более гидрофильные линкеры [31, 45]. Таким образом, общая стратегия конъюгирования подбирается на основе свойств цитотоксической нагрузки.

Ранние методы конъюгации основывались на реакционной способности нативных аминокислот для связывания лекарств с АТ. Первичный амин бокового радикала лизина легко вступает в реакцию с активированными группами линкерных фрагментов, обеспечивая лизинспецифическую конъюгацию. При всем том IgG содержат избыток подобных сайтов конъюгации, приводящих к значительной гетерогенности продукта. Так, отмечается практически 50-про-

Таблица 3. Лекарственные вещества, выступающие в качестве полезной нагрузки [4, 44]
Table 3. Drugs acting as a payload [4, 44]

Группа веществ Group of drugs	Механизм действия Mechanism of action	Примеры Examples
Вещества, наце- ленные на микро- трубочки Microtubules-targeting drugs	Нарушают полимеризацию тубулина, тем самым блоки- руя митотическое деление быстрорастущих опухолевых клеток. К подобной группе также относят ингибиторы кинезина, участвующего в непосредственном образова- нии веретен деления Disrupt tubulin polymerization, thereby blocking mitotic division of rapidly growing tumor cells. This group also includes inhibitors of kinesin, which is involved in the direct formation of division spindles	Майтанзиноиды Maytansinoids
		Ауристатины Auristatins
		Эрибулин Eribulin
		Тубулизины Tubulysins
		Криптофицины Cryptophycins
Вещества, наце- ленные на ДНК DNA-targeting drugs	Воздействуют на полный клеточный цикл опухолевой клетки путем расщепления двойной цепочки ДНК (эне- диины), ингибирования топоизомеразы (экзатеканы), а также алкилирования (PBD, дуокармицины) Affect the complete cell cycle of the tumor cell by cleaving the DNA double strand (enediynes), inhibiting topoisomerase (exatecans), and alkylating (PBD, duocarmycins)	Энедиины (каликхеамицины, унциала- мицины) Enediynes (calicheamicins, uncialamycins)
		Экзатеканы Exatecans
		Пирролобензодиазепины (PBD) Pyrrolobenzodiazepines (PBD)
		Дуокармицины Duocarmycins
Вещества, наце- ленные на РНК RNA-targeting drugs	Ингибируют сплайсинг РНК (тайланстатины) или про- цесс транскрипции (аматоксины). Ожидается, что ис- пользование данных веществ позволит преодолеть про- блему резистентности к терапии антимитотическими агентами ряда медленно пролиферирующих опухолей Inhibit RNA splicing (thailanstatins) or the transcription process (amatoxins). The use of these drugs is expected to overcome the problem of resistance to therapy with antimitotic agents in a number of slowly proliferating tumors	Тайланстатины Thailanstatins
		Аматоксины Amatoxins
Иммуотропные вещества Immunotropic drugs	Стимулируют врожденный иммунный ответ против опухоли и способствуют мобилизации опухолеспеци- фичных иммунокомпетентных клеток. Stimulate anti-tumor innate immune response and promote mobilization of tumor-specific immunocompetent cells	Агонисты Toll-подобных рецепторов Toll-like receptor agonists
		Агонисты сигнального пути STING Agonists of the STING pathway

центное содержание неконъюгированных АТ в пре-
парате Милотарг® (гемтузумаб озогамидин), которые
могут конкурировать с конъюгированными за погло-
щение клетками-мишенями. Помимо этого, такая
стохастическая конъюгация может затрагивать обла-
сти, определяющие комплементарность АТ (comple-
mentarity-determining regions, CDR), что в итоге может
снижать ее авидность [46–48].

Другая стратегия конъюгации основана на реакци-
онной способности тиольной группы предварительно
восстановленных цистеинов. АТ изотипов IgG1 и G4
имеют 4 межцепочные дисульфидные связи, которые
легче восстанавливаются дитиотреитолом, по сравне-
нию с аналогичными внутрицепочными, а значит, чис-

ло потенциальных сайтов конъюгации кратно сокра-
щается. Подобный метод способствует улучшению
гомогенности получаемого препарата и является наи-
более часто используемым. Однако восстановление
межцепочной дисульфидной связи может разрушить
целостность АТ, из-за чего становится необходимым
конъюгировать уже тяжелые цепи между собой с по-
мощью цистеинсвязывающих групп [4, 46, 49, 50].

Достижения генной инженерии сделали возмож-
ным сайт-специфичную конъюгацию цитостатиков
с АТ. Данный способ реализуется посредством констру-
ирования АТ со специально введенными группами,
такими как цистеин, глутамин. Так же используются
неприродные аминокислоты (p-ацетилфенилаланин)

Таблица 4. Сравнительная характеристика некоторых методов конъюгации

Table 4. Comparative characteristics of some conjugation methods

Группа методов Group of methods	Конъюгация Conjugation	Преимущество Advantage	Недостаток Disadvantage	Ссылка Reference
Стохастическая конъюгация Stochastic conjugation	По остаткам лизина Conjugation by lysine residues	Простота и быстрота метода Simplicity and rapidity of the method	Высокая гетерогенность конъюгатов High heterogeneity of conjugates Низкий терапевтический индекс Low therapeutic index Неконтролируемый процесс Uncontrolled process	[4, 53]
	По остаткам восстановленных цистеинов Conjugation by reduced cysteine residues	Сниженная гетерогенность смеси Reduced heterogeneity of the mixture	Структура антитела может быть нарушена The antibody structure may be broken Возможность преждевременного высвобождения нагрузки при использовании малеимидных линкеров Potential for premature payload release when using maleimide linkers	[4, 46, 54]
Сайт-специфичная конъюгация Site-specific conjugation	По сконструированным цистеинам (технология ThioMab) Conjugation by engineered cysteines (ThioMab technology)	Высокая эффективность конъюгации (~90 %) High efficiency of conjugation (~90 %) Высокая гомогенность конъюгатов High homogeneity of conjugates Масштабируемый процесс Scalable process	Потенциальная нестабильность <i>in vivo</i> Potential instability <i>in vivo</i>	[4, 50]
	По сконструированным неприродным аминокислотам Conjugation by engineered unnatural amino acids	Высокая гомогенность конъюгатов High homogeneity of conjugates Высокая эффективность конъюгации High efficiency of conjugation Процесс конъюгации масштабируемый The conjugation process is scalable	Конъюгация по сайту p-ацетилфенилаланина происходит при pH ~5, что исключает конъюгацию ацидофобных веществ Conjugation at the p-acetylphenylalanine site occurs at pH ~5, which precludes conjugation of acidophobic drugs Потенциальная иммуногенность Potential immunogenicity Дополнительно требуется специфичная к ненатуральным аминокислотам эффективной транспортной РНК-синтазы An efficient transport RNA synthetase specific for non-natural amino acids is required	[4, 14, 55]
	Ферментассоциированное лигирование Enzyme-assisted ligation	DAR = 2–4 Высокая эффективность конъюгации High efficiency of conjugation	Необходима аминокислотная последовательность распознавания для фермента, что сопряжено с риском иммуногенности An amino acid recognition sequence for the enzyme is required, which carries a risk of immunogenicity	[4, 14]

или короткие пептидные метки. В дальнейшем осуществляется химическая или химико-энзиматическая конъюгация с получением более гомогенного продукта. Несмотря на улучшенное распределение DAR, стратегия имеет ряд ограничений. Прежде всего введение неприродных аминокислот в структуру АТ способно повысить риск нежелательных реакций со стороны иммунной системы пациента. Нарботка подобных ИК в терапевтических целях требует отработанной технологии инженерии клеточных линий — продуцентов модифицированных МкАТ [51, 52]. Следовательно, значительно усложняются требо-

вания к материально-технической базе организаций, занятых разработкой и промышленным производством подобных препаратов.

Заключение

Достижения научно-технического прогресса сделали возможным доставку биологически активных веществ непосредственно к опухолевым клеткам, минимизируя токсический эффект в отношении здоровых тканей. Как препараты таргетной онкотерапии ИК в настоящее время все еще находятся на этапе своего развития, несмотря на его более чем полувековую

историю. Их число и перспективы применения растут, десятки подобных соединений уже получили разрешение на медицинское применение, другие находятся в разработке, на доклинических и клинических исследованиях. Вместе с тем фармацевтическая разработка подобных препаратов должна учи-

тывать множество исходных данных: начиная от целевого антигена и заканчивая биотехнологическими аспектами производства. Несомненно, что дальнейшие исследования в подборе векторных компонентов, химии линкеров и методов конъюгации приблизят человека к получению «волшебных пуль» Эрлиха.

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

- World Health Organization / Global cancer burden growing, amidst mounting need for services. Available at: <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>. Accessed: 17.02.2024.
- Pearce A., Haas M., Viney R. et al. Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study. *PLoS One* 2017;12(10):e0184360. DOI: 10.1371/journal.pone
- Schirmacher V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int J Oncol* 2019;54(2):407–19. DOI: 10.3892/ijo.2018.4661
- Fu Z., Li S., Han S. et al. Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther* 2022;7(1):93. DOI: 10.1038/s41392-022-00947-7
- Shefet-Carasso L., Benhar I. Antibody-targeted drugs and drug resistance — challenges and solutions. *Drug Resist Updat* 2015;18:36–46. DOI: 10.1016/j.drug.2014.11.001
- Mathe G., Tran Ba Lo., Bernard J. Effet sur la leucémie 1210 de la souris d’une combinaison par diazotation d’A-méthoptérine et de gamma-globulines de hamsters porteurs de cette leucémie par hétérogreffe. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1958;246(10):1626–8. Mathe G., Tran Ba Lo., Bernard J. Effect on mouse leukemia 1210 of a combination by diazo-reaction of amethopterin and gamma-globulins from hamsters inoculated with such leukemia by heterografts. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1958;246(10):1626–8. (In French).
- Ghose T., Nigam S.P. Antibody as carrier of chlorambucil. *Cancer* 1972;29(5):1398–400. DOI: 10.1002/1097-0142(197205)29:5<1398::aid-cnrcr280290542>3.0.co;2-d
- Chari R.V. Targeted delivery of chemotherapeutics: tumor-activated prodrug therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;31(1-2):89–104. DOI: 10.1016/s0169-409x(97)00095-1
- Будчанов Ю.И. Моноклональные антитела: от создания до клинического применения. *Клиническая онкогематология* 2016;9(3):237–44. DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-237-244 Budchanov Yu.I. Monoclonal antibodies: From development to clinical application. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2016;9(3):237–44. (In Russ.). DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-237-244
- Walker S., Landovitz R., Ding W.D. et al. Cleavage behavior of calicheamicin gamma 1 and calicheamicin T. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(10):4608–12. DOI: 10.1073/pnas.89.10.4608
- Vukovic N., van Elsas A., Verbeek J.S., Zaiss D.M.W. Isotype selection for antibody-based cancer therapy. *Clin Exp Immunol* 2021;203(3):351–65. DOI:10.1111/cei.13545
- Chari R.V. Targeted cancer therapy: Conferring specificity to cytotoxic drugs. *Acc Chem Res* 2008;41(1):98–107. DOI: 10.1021/ar700108g
- Hamblett K.J., Senter P.D., Chace D.F. et al. Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. *Clin Cancer Res* 2004;10(20):7063–70. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0789
- Beck A., Goetsch L., Dumontet C., Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat Rev Drug Discov* 2017;16(5):315–37. DOI: 10.1038/nrd.2016.268
- Sheyi R., de la Torre B.G., Albericio F. Linkers: An assurance for controlled delivery of antibody-drug conjugate. *Pharmaceutics* 2022;14(2):396. DOI: 10.3390/pharmaceutics14020396
- Ruan D.Y., Wu H.X., Meng Q., Xu R.H. Development of antibody-drug conjugates in cancer: Overview and prospects. *Cancer Commun (Lond)* 2024;44(1):3–22. DOI: 10.1002/cac2.12517
- Swaminathan M., Cortes J.E. Update on the role of gemtuzumab-ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia. *Ther Adv Hematol* 2023;14:20406207231154708. DOI: 10.1177/20406207231154708
- Lai C., Kandahari A.M., Ujjani C. The evolving role of brentuximab vedotin in classical hodgkin lymphoma. *Blood Lymphat Cancer* 2019;9:63–71. DOI: 10.2147/BLCTT.S231821
- Ferraro E., Drago J.Z., Modi S. Implementing antibody-drug conjugates (ADCs) in HER2-positive breast cancer: State of the art and future directions. *Breast Cancer Res* 2021;23(1):84. DOI: 10.1186/s13058-021-01459-y
- Cox E., Wade R., Peron M. et al. the clinical and cost effectiveness of inotuzumab ozogamicin for the treatment of adult relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukaemia: An evidence review group evaluation of a NICE single technology appraisal. *Pharmacoeconomics* 2019;37(9):1081–91. DOI: 10.1007/s40273-019-00779-4
- Lin A.Y., Dinner S.N. Moxetumomab pasudotox for hairy cell leukemia: Preclinical development to FDA approval. *Blood Adv* 2019;3(19):2905–10. DOI: 10.1182/bloodadvances.2019000507
- Wong R.L., Yu E.Y. Enfortumab vedotin in the treatment of urothelial cancers and beyond. *Future Oncol* 2022;18(27):3067–84. DOI: 10.2217/fon-2022-0328
- Indini A., Rijavec E., Grossi F. Trastuzumab deruxtecan: Changing the destiny of HER2 expressing solid tumors. *Int J Mol Sci* 2021;22(9):4774. DOI: 10.3390/ijms22094774
- Pavone G., Motta L., Martorana F. et al. A new kid on the block: Sacituzumab govitecan for the treatment of breast cancer and other solid tumors. *Molecules* 2021;26(23):7294. DOI: 10.3390/molecules26237294
- Lassiter G., Bergeron C., Guedry R. et al. Belantamab mafodotin to treat multiple myeloma: A comprehensive review of disease, drug efficacy and side effects. *Curr Oncol* 2021;28(1):640–60. DOI: 10.3390/curroncol28010063
- Gomes-da-Silva L.C., Kepp O., Kroemer G. Regulatory approval of photodynamic therapy: Photodynamic therapy that induces immunogenic cell death. *Oncoimmunology* 2020;9(1):1841393. DOI: 10.1080/2162402X.2020.1841393
- Lee A. Loncastuximab tesirine: First approval. *Drugs* 2021;81(10):1229–33. DOI: 10.1007/s40265-021-01550-w
- Shi F., Liu Y., Zhou X. et al. Disitamab vedotin: A novel antibody-drug conjugates for cancer therapy.

- Drug Deliv 2022;29(1):1335–44.
DOI: 10.1080/10717544.2022.2069883
29. Markham A. Tisotumab vedotin: First approval. *Drugs* 2021;81(18):2141–7. DOI: 10.1007/s40265-021-01633-8
 30. Heo Y.A. Mirvetuximab soravtansine: First approval. *Drugs* 2023;83(3):265–73. DOI: 10.1007/s40265-023-01834-3
 31. Tsuchikama K., An Z. Antibody-drug conjugates: Recent advances in conjugation and linker chemistries. *Protein Cell* 2018;9(1):33–46. DOI: 10.1007/s13238-016-0323-0
 32. Lucas A.T., Moody A., Schorzman A.N., Zamboni W.C. Importance and considerations of antibody engineering in antibody-drug conjugates development from a clinical pharmacologist's perspective. *Antibodies (Basel)* 2021;10(3):30. DOI: 10.3390/antib10030030
 33. Tourdot S., Baltrunkonis D., Denies S. et al. Proceedings of the 14th European immunogenicity platform open symposium on immunogenicity of biopharmaceuticals. *MAbs* 2024;16(1):2324801. DOI: 10.1080/19420862.2024.2324801
 34. Uppal H., Doudement E., Mahapatra K. et al. Potential mechanisms for thrombocytopenia development with trastuzumab emtansine (T-DM1). *Clin Cancer Res* 2015;21(1):123–33. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2093
 35. Bargh J.D., Isidro-Llobet A., Parker J.S., Spring D.R. Cleavable linkers in antibody-drug conjugates. *Chem Soc Rev* 2019;48(16):4361–74. DOI: 10.1039/c8cs00676h
 36. Dubowchik G.M., Firestone R.A., Padilla L. et al. Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: Model studies of enzymatic drug release and antigen-specific *in vitro* anticancer activity. *Bioconj Chem* 2002;13(4):855–69. DOI: 10.1021/bc025536j
 37. Willner D., Trail P.A., Hofstead S.J. et al. (6-Maleimidocaproyl) hydrazone of doxorubicin – A new derivative for the preparation of immunoconjugates of doxorubicin. *Bioconj Chem* 1993;4(6):521–7. DOI: 10.1021/bc00024a015
 38. Kellogg B.A., Garrett L., Kovtun Y. et al. Disulfide-linked antibody-maytansinoid conjugates: Optimization of *in vivo* activity by varying the steric hindrance at carbon atoms adjacent to the disulfide linkage. *Bioconj Chem* 2011;22(4):717–27. DOI: 10.1021/bc100480a
 39. Caculitan N.G., Dela Cruz Chuh J., Ma Y. et al. Cathepsin B is dispensable for cellular processing of cathepsin B-cleavable antibody-drug conjugates. *Cancer Res* 2017;77(24):7027–37. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2391
 40. Kolodych S., Michel C., Delacroix S. et al. Development and evaluation of β -galactosidase-sensitive antibody-drug conjugates. *Eur J Med Chem* 2017;142:376–82. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.08.008
 41. Lu J., Jiang F., Lu A., Zhang G. Linkers having a crucial role in antibody-drug conjugates. *Int J Mol Sci* 2016;17(4):561. DOI: 10.3390/ijms17040561
 42. Conilh L., Sadilkova L., Viricel W., Dumontet C. Payload diversification: A key step in the development of antibody-drug conjugates. *J Hematol Oncol* 2023;16(1):3. DOI: 10.1186/s13045-022-01397-y
 43. Anderl J., Faulstich H., Hechler T., Kulke M. Antibody-drug conjugate payloads. *Methods Mol Biol* 2013;1045:51–70. DOI: 10.1007/978-1-62703-541-5_4
 44. Wang Z., Li H., Gou L. et al. Antibody-drug conjugates: Recent advances in payloads. *Acta Pharm Sin B* 2023;13(10):4025–59. DOI: 10.1016/j.apsb.2023.06.015
 45. Buecheler J.W., Winzer M., Weber C., Gieseler H. Alteration of physicochemical properties for antibody-drug conjugates and their impact on stability. *J Pharm Sci* 2020;109(1):161–8. DOI: 10.1016/j.xphs.2019.08.006
 46. Goulet D.R., Atkins W.M. Considerations for the design of antibody-based therapeutics. *J Pharm Sci* 2020;109(1):74–103. DOI: 10.1016/j.xphs.2019.05.031
 47. Chio T.I., Bane S.L. Click chemistry conjugations. *Methods Mol Biol* 2020;2078:83–97. DOI: 10.1007/978-1-4939-9929-3_6
 48. Sadiki A., Vaidya S.R., Abdollahi M. et al. Site-specific conjugation of native antibody. *Antib Ther* 2020;3(4):271–84. DOI: 10.1093/abt/tbaa027
 49. Hagihara Y., Saerens D. Engineering disulfide bonds within an antibody. *Biochim Biophys Acta* 2014;1844(11):2016–23. DOI: 10.1016/j.bbapap.2014.07.005
 50. Gordon M.R., Canakci M., Li L. et al. Field guide to challenges and opportunities in antibody-drug conjugates for chemists. *Bioconj Chem* 2015;26(11):2198–215. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00399
 51. Zhou Q. Site-Specific Antibody Conjugation with Payloads beyond Cytotoxins. *Molecules* 2023;28(3):917. DOI: 10.3390/molecules28030917
 52. Hallam T.J., Smider V.V. Unnatural amino acids in novel antibody conjugates. *Future Med Chem* 2014;6(11):1309–24. DOI: 10.4155/fmc.14.79
 53. Kostova V., Désos P., Starck J.B., Kotschy A. The chemistry behind ADCs. *Pharmaceuticals (Basel)* 2021;14(5):442. DOI: 10.3390/ph14050442
 54. Behrens C.R., Ha E.H., Chinn L.L. et al. Antibody-drug conjugates (ADCs) Derived from interchain cysteine cross-linking demonstrate improved homogeneity and other pharmacological properties over conventional heterogeneous ADCs. *Mol Pharm* 2015;12(11):3986–98. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00432
 55. Hallam T.J., Wold E., Wahl A., Smider V.V. Antibody conjugates with unnatural amino acids. *Mol Pharm* 2015;12(6):1848–62. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00082

Благодарность. Автор выражает благодарность за помощь в написании данной обзорной статьи сотрудникам лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России А.П. Колпаксиди и М.В. Дмитриевой.

Gratitude. The author expresses gratitude for the help in writing this review article to the staff of the Laboratory for the Development of dosage forms of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology Ministry of Health of Russia Alexander P. Kolpaksidi and Maria V. Dmitrieva.

ORCID автора / ORCID of author

С.Д. Щеглов / S.D. Shceglov: <https://orcid.org/0009-0002-0777-0422>

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа была выполнена при финансовой поддержке Минздрава России в рамках исследования № 123021500025-1 «Разработка нового класса противоопухолевых препаратов, основанных на таргетной стимуляции сигнального пути STING в злокачественных новообразованиях».

Funding. The work was carried out with the financial support of the Ministry of Health of Russia in the framework of the research No 123021500025-1 “Development of a new class of antitumor drugs based on targeting stimulation of the STING signaling pathway in malignant neoplasms”.

Статья поступила: 11.03.2024. **Принята в печать:** 22.04.2024.

Article received: 11.03.2024. **Accepted for publication:** 22.04.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-47-59>

Перспективы анти-EVs-терапии в аспекте меланомы кожи

В.А. Шитиков, Е.Н. Кособокова*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24***Контакты:** Василий Андреевич Шитиков vasilbox@yandex.ru

Введение. Внеклеточные везикулы (EVs) играют большую роль в прогрессировании меланомы кожи: способствуют ускользанию от иммунитета, приобретению резистентности к лекарственной терапии и метастазированию. Воздействуя на процесс сборки EVs, а также выделившиеся везикулы опухолевых клеток и их микроокружения, можно добиться значительного снижения количества везикул, способных передавать сигналы и транспортировать макромолекулы. Таким образом, блокирование данной системы передачи информации на разных ее уровнях может быть новым способом лекарственной терапии злокачественных новообразований. На данный момент существует ряд малых синтетических молекул, нарушающих синтез экзосом и микровезикул (ингибиторы нейтральной сфингомиелиназы, кальпаина, Rho-ассоциированных протеинкиназ), а также их конъюгаты для борьбы с экзосомальными механизмами устойчивости к терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета. Помимо угнетения сборки EVs в качестве мишени таргетной терапии рассматривают мембранные белки EVs (семейство белков теплового шока HSPA/HSP70, ламининсвязывающих интегринов $\alpha 3\beta 1$ и $\alpha 6\beta$). Идентифицированы также некоторые рецепторы, обеспечивающие специфическое слияние везикул с клетками-реципиентами (CD46-рецептор, участвующий в интернализации экзосом линии клеток опухоли с метастазами в мозг, SK-Mel-28, множество адгезивных молекул, принадлежащих к семейству интегринов, иммуноглобулинов и селектинов, а также CD44 и тетраспанинов).

Цель исследования – рассмотрение имеющегося опыта воздействия на биогенез EVs опухолей для разработки возможной терапевтической стратегии лечения меланомы кожи, вышедшей из-под контроля иммунных и таргетных препаратов.

Материалы и методы. В работе представлены результаты исследований EVs меланомы кожи и способов влияния на EVs-коммуникацию. Поиск соответствующих источников произведен в системах Web of Science, PubMed, eLibrary.ru. Использовали также инструмент Elicit для поиска научных статей.

Заключение. В данной работе проанализировано действие малых синтетических молекул, моноклональных антител и регуляторных РНК на разные звенья биогенеза EVs опухоли: сборку, секрецию EVs, а также их транспорт. Сделаны выводы о состоятельности анти-EVs-терапии на сегодняшний момент и возможности ее применения в аспекте меланомы кожи.

Ключевые слова: EVs, внеклеточные везикулы, меланома кожи, терапия

Для цитирования: Шитиков В.А., Кособокова Е.Н. Перспективы анти-EVs-терапии в аспекте меланомы кожи. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(2):47–59.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-47-59>

Prospects for anti-EVs therapy in the context of skin melanoma

Vasily A. Sheetikov, Ekaterina N. Kosobokova*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia***Contacts:** Vasily Andreevich Sheetikov vasilbox@yandex.ru

Background. Extracellular vesicles (EVs) play a major role in the progression of skin melanoma: contributing to immune evasion, acquisition of resistance to drug therapy and metastasis. By affecting the assembly process of EVs as well as the secreted vesicles of tumor cells and their microenvironment, a significant reduction in the number of vesicles capable of transmitting signals and transporting macromolecules can be achieved. Thus,

blocking this information transmission system at its different levels may be a new way of drug therapy of malignant neoplasms. Currently, there are a number of small synthetic molecules that disrupt the synthesis of exosomes and microvesicles (inhibitors of neutral sphingomyelinase, calpain, Rho-associated protein kinases) and their conjugates to combat exosomal mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitor therapy. In addition to inhibition of EVs assembly, membrane proteins of EVs (heat shock protein family HSPA/HSP70, laminin-binding integrins $\alpha 3 \beta 1$ and $\alpha 6 \beta$) are considered as targets of targeted therapy. Some receptors providing specific fusion of vesicles with recipient cells have also been identified (CD46 receptor involved in the internalization of exosomes of a tumor cell line with brain metastases, SK-Mel-28, many adhesive molecules belonging to the family of integrins, immunoglobulins and selectins, as well as CD44 and tetraspanins).

Aim. To review the available attempts to influence the biogenesis of tumor EVs (EVs) in order to develop a possible therapeutic strategy for the treatment of skin melanoma that has escaped the control of immune and targeting drugs.

Materials and methods. In this work we present the results of research on melanoma of skin EVs and ways to influence EVs communication. The relevant sources were searched in Web of Science, PubMed, eLibrary.ru. The Elicit tool for searching scientific articles was also used.

Conclusion. In this work we analyzed the effect of small synthetic molecules, monoclonal antibodies and regulatory RNAs on different parts of tumor EVs biogenesis: assembly, secretion of EVs, and their transport. Conclusions are drawn about the validity of anti-EVs therapy to date and the possibility of its application in the aspect of skin melanoma.

Keywords: EVs, extracellular vesicles, skin melanoma, treatment

For citation: Sheetikov V.A., Kosobokova E.N. Prospects for anti-EVs therapy in the context of skin melanoma. *Rossiiskij bioterapevticeskij zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(2):47–59. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-47-59>

Введение

Транспорт биологически активных макромолекул с помощью внеклеточных везикул (Extracellular Vesicles, EVs) — это один из главенствующих способов межклеточной коммуникации. Опухолевые клетки (ОК) и их микроокружение не исключение, взаимная связь между ОК, окружающей их стромой и другими отдаленными клетками организма способствует ускользанию от иммунитета [1], приобретению резистентности к лекарственной терапии (ЛТ) [2] и метастазированию [3]. Блокирование данной системы передачи информации на разных ее уровнях может быть новым способом ЛТ злокачественных новообразований [4, 5].

Разные типы везикул отличаются не только размером и составом, но и механизмом образования. Данные процессы во многом фундаментальны и происходят в большинстве клеток человека. Однако в ОК биогенез EVs усилен [6, 7] и играет большую роль в развитии устойчивости ЛТ, что уже говорит о возможности использования блокирования опорных путей сборки EVs как еще одного механизма цитостатического действия. Для ограничения количества мишеней теоретически можно выделить наиболее важные в передаче определенного сигнала популяции EVs и преобладающий способ их образования, т.е. каким типом EVs они являются (экзосомами или микровезикулами — МВ).

В аспекте меланомы кожи описанная стратегия, даже при вероятном отсутствии таргетности и наличии ряда побочных эффектов, может быть оправдана проблемой развития лекарственной устойчивости

к таргетной терапии или вторичной резистентности к ингибиторам иммунологических контрольных точек (ИКТИ). Стоит вспомнить исследование научной группы М. Poggio и соавт., доказавшей важность экзосомальной фракции PD-L1 (лиганд белка программированной гибели клеток 1) в развитии резистентности к ИКТИ [8]. Производилась оценка клеточного состава лимфатических узлов (ЛУ) и маркеров истощения Т-клеток после инъекции ОК дикого типа и мутантов с опосредованной CRISPR/Cas9 делецией Rab27a и PD-L1. В результате показано, что экзосомный PD-L1 ОК подавляет активацию Т-клеток в дренирующем ЛУ в отличие от мембранной фракции PD-L1. К тому же удаление экзосомного PD-L1 ингибировало рост опухоли даже у моделей, устойчивых к анти-телам (АТ) против PD-L1 (сингенные модели колоректального и рака предстательной железы) [8].

Сочетание блокирования EVs-коммуникации с уже использующейся тактикой лекарственного лечения меланомы кожи, возможно, способно отсрочить время наступления резистентности и появления новых метастазов.

В обзоре после краткого описания разных звеньев биогенеза EVs рассмотрены потенциальные блокаторы EVs-коммуникации, которые применялись на моделях меланомы кожи и других опухолей, с оценкой перспективности их применения в ЛТ.

Материалы и методы

В работе представлены результаты исследований EVs меланомы кожи и способов влияния на

EVs-коммуникацию. Поиск соответствующих источников проведен в системах Web of Science, PubMed, eLibrary.ru. Использовали также инструмент Elicit для поиска научных статей. Поиск охватил за период 1975–2023 гг. Информационный поиск имел как библиографический (в PubMed, eLibrary.ru, Web of Science), так и полнотекстовый (в Elicit) характер. Поиск проводили по булевой и диалоговой моделям. Для управления данными применяли программу Zotero.

Рассмотрены для включения в обзор только оригинальные исследовательские статьи, написанные на английском или русском языках. Исследования включали, если в них были зафиксированы или описаны попытки угнетения EVs-коммуникации: подавление синтеза EVs или предотвращение взаимодействия EVs с клетками-реципиентами, сопровождающееся внешними изменениями экспериментальной модели в сравнении с контролем. Для предоставления полной картины изучаемого вопроса также включали статьи, опровергающие успешность применения ранее предсказанных мишеней и блокаторов.

Исключали исследования, где возможное влияние на EVs-коммуникацию не подтверждалось с помощью NTA (анализа траекторий наночастиц), иммуноферментного анализа маркеров везикул или другими методами подтверждения качественных и количественных изменений популяций везикул. Кроме того, исключали все исследования, для которых не удалось получить полный текст.

Анализ статей проводился на основе выявления статистических ошибок: использование неподходящих методов проверки гипотез, проблема множественных сравнений, способы сравнения групп, не соответствующие типу признака.

Блокирование образования EVs

В большинстве случаев блокирование соединений, участвующих в биогенезе EVs, выполняется с целью фундаментального изучения природы опухоли. Сегодня применение ингибиторов синтеза EVs не стандартизовано, многие исследования недооценивают вероятность применения данных реактивов в опасных для живой клетки дозах, поэтому в нашем обзоре будут рассмотрены ингибиторы синтеза EVs, показавшие эффективность в нетоксичных для клетки дозах [9]. К тому же неспецифические взаимодействия ингибиторов и плеiotропный эффект их мишеней в клетке также являются главными препятствиями для реального клинического применения описанных блокаторов.

Рассмотрим основные пути образования EVs в аспекте меланомы кожи и результаты попыток нокаута и ингибирования разных звеньев данных механизмов.

Биогенез экзосом

Экзосомы представляют собой разновидность EVs эндосомального происхождения. Существует 2 основных пути сборки экзосом (рис. 1, а):

- 1) ESCRT-зависимый путь (ESCRT – endosomal sorting complex required for transport), при котором компоненты эндосомального комплекса сортировки последовательно рекрутируются в мембрану эндосомы. Этот процесс начинается с домена Hrs, который связывается с фосфатидилинозитол-3-фосфатом, 3,5-бисфосфатом и убиквитинированным белком. ESCRT направляет убиквитинированные белки в мультивезикулярные тельца (Multivesicular Bodies, MVBs), образуя в последних внутрипросветные везикулы (Intraluminal Vesicles, ILVs).
- 2) Церамидзависимый путь основан на образовании липидных рафт, в которых сфингомиелин превращается в церамид нейтральной сфингомиелиназой (nSMase). Эти обогащенные участки мембраны эндосомы имеют структурный дисбаланс между монослоями, вызывающий загиб мембраны внутрь и образование внутрипросветных везикул внутри мультивезикулярного тельца [10].

Образовавшиеся мультивезикулярные тельца транспортируются в плазматическую мембрану, и в результате слияния внутрипросветные везикулы (ILV) высвобождаются во внеклеточную среду и теперь называются экзосомами. Слияние MVB с плазматической мембраной представляет собой строго регулируемый многоступенчатый процесс, который включает транспортировку MVB по микротрубочкам, стыковку на плазматической мембране и SNARE-опосредованное слияние (soluble N-ethylmaleimide-sensitive component attachment protein receptor – растворимый N-этилмалеимид-чувствительный белковый рецептор присоединения).

Ингибирование нейтральной сфингомиелиназы

Одним из перспективных способов нарушения секреции EVs оказалось блокирование главного фермента церамидозависимого пути образования экзосом, нейтральной сфингомиелиназы. Ингибирование или нокаут сфингомиелиназы снижает уровень метастазирования и ангиогенеза в опухоли [5].

Мощным и специфичным ингибитором нейтральной сфингомиелиназы (nSMase) является проходящее через клеточные мембраны соединение GW4869 [11]. Индуцированное GW4869 ингибирование секреции экзосом в культуре клеток мышинной меланомы B16-BL6 снижало пролиферацию клеток (количество выделенных EVs после обработки уменьшалось приблизительно в 3 раза, снижая количество

клеток примерно в 1,42 раза по сравнению с контролем) [12].

В 2021 г. разработана комбинация экзосомного ингибитора (GW4869) и индуктора ферроптоза (Fe^{3+}) с использованием амфифильной гиалуроновой кислоты [13] для борьбы с экзосомальными механизмами устойчивости к терапии ИКТИ [8, 14]. Испытания описанной комбинации в сконструированном наноблоке показало активацию иммунного ответа против клеток меланомы B16F10, стимуляцию цитотоксических Т-лимфоцитов и иммунологической памяти. Нанозлемент (НЭ) усиливает реакцию иммунокомпетентных клеток при блокаде контрольной точки PD-L1. Ферроптоз ОК модулирует иммунозначимый воспалительный ответ и обеспечивает активацию и созревание дендритных клеток костного мозга.

Научная группа получила НЭ, где в роли амфифильного носителя выступает конъюгат гиалуроновой кислоты с 5β -холановой кислотой. Fe^{3+} координируется с полифенолом конъюгата, а GW4869 инкапсулируется в гидрофобную фазу НЭ. GW4869 из НЭ значительно снижал экзосомный биомаркер CD63 клеток B16F10 на вестерн-блотте, при этом свободный GW4869 оказывал меньшее влияние на CD63. Снижение секреции экзосомом соответственно резко снижает уровень экзосомального PD-L1, о важности которого говорилось в начале.

Затем мышей, несущих опухоль B16F10, использовали для определения экзосомного ингибирования НЭ *in vivo*. При проведении вестерн-блоттинга выделенных из опухолевой ткани экзосом белковые полосы CD63 и PD-L1 в группе клеток, обработанных НЭ, были едва заметны, что указывает на значительное ингибирование GW4869 биогенеза опухолевых везикул, в том числе несущих PD-L1.

Проверено влияние лечения на систему противоопухолевого ответа: изолированно НЭ с GW4869 способствовали созреванию дендритных клеток на 36,7 %. Комбинированное лечение анти-PD-L1 с НЭ увеличивало время выживания мышей C57BL/6 с прививаемыми B16F10 клетками. Максимальная продолжительность жизни при анти-PD-L1 терапии составляла 31 день наблюдения. Лечение НЭ при комбинации с ИКТИ и в виде монотерапии обеспечивало время максимальной продолжительности жизни, выходящее за период 60-дневного наблюдения [13].

Несмотря на успех приведенной разработки в предотвращении резистентности к ИКТИ, отсутствие таргетного действия подобных НЭ может стать причиной побочных эффектов, связанных с ингибированием нейтральной сфингомиелиназы в здоровых клетках. Например, острое образование церамида, опосредованное nSMase, и его последующее превращение в сфингозин-1-фосфат (один из метаболитов

обмена церамидов) необходимо для правильного функционирования эндотелия микрососудов человека. Таким образом, терапевтические стратегии, направленные на значительное снижение образования церамидов (в том числе ингибирование nSMase), могут оказаться пагубными для микроциркуляторного русла [15]. Проникновение препарата на основе GW4869 через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) может повлиять на модуляцию постсинаптических потенциалов [16] и память [17].

Специфичные Rab-ГТФазы как возможные мишени

Основным недостатком многих ингибиторов сборки EVs, как уже упоминалось ранее, является отсутствие таргетности действия, поэтому при выборе новых кандидатов в роли слабого звена опухолевой коммуникации могут выступать Rab-ГТФазы, имеющие тканеспецифичные формы. Они играют центральную роль в образовании транспортных носителей из донорной мембраны, перемещении этих носителей по цитоскелетным путям и, наконец, закреплении и слиянии с правильной акцепторной мембраной [18], в том числе обеспечивая транспорт и слияние MVB с плазматической мембраной.

Небольшие Rab GTPases (например, RAB27A, RAB27B и RAB11) [19], как полагают, участвуют в биогенезе и секреции экзосом. Показано, что РНК-интерференция RAB27A в клетках меланомы снижает продукцию экзосом [20]. RAB27A способствует стыковке MVBs и слиянию с плазматической мембраной, тогда как RAB27B помогает в переносе пузырьков из комплекса Гольджи в MVBs и в мобилизации MVBs в богатую актином зону под плазматической мембраной. RAB27A играет важную роль в транспорте не только EVs, но и меланосом в меланоцитах [21], при этом RAB27A сверхэкспрессируется в меланомах разного вида по сравнению с доброкачественными невусами [20, 22, 23]. Таким образом, специфичные Rab-ГТФазы потенциально могут быть мишенями в анти-EVs-терапии.

В данном обзоре мы разбирали только часто используемые ингибиторы синтеза EVs, которые подтвердили свою эффективность в нетоксичных для клетки дозах [9] и имеющих опыт применения на культурах клеток и мышинных моделях меланомы. С более широким описанием данных соединений можно ознакомиться в обзоре M. Catalano и L. O'Driscoll [11].

Биогенез микровезикул

Помимо описанных ранее экзосом и способов ингибирования их секреции существуют и другие виды EVs (МВ и апоптотические тельца) со своими механизмами биогенеза и мишенями для блокировки.

Несмотря на преобладание исследований, посвященных экзосомам, полученным из меланомы, МВ также могут способствовать развитию и прогрессированию заболевания. Показано, что различные клеточные линии меланомы высвобождают МВ, которые демонстрировали способность повышать метастатический потенциал [24–26]. Наконец, МВ могут участвовать во взаимодействиях «опухоль — строма» [27] и подавлять иммунный ответ [28].

Так, МВ образуются за счет нуклеации плазматической мембраны в межклеточное пространство, которая начинается с кластеризации трансмембранных белков и липидов в различных доменах (рис. 1, б). Рекрутируемые и мембранно-ассоциированные белки, такие как тетраспанины (в основном все еще неопознанные), могут быть вовлечены в сортировку компонентов, аналогичную экзосомальной. Активация ферментов, высвобождение и накопление Ca^{2+} ,

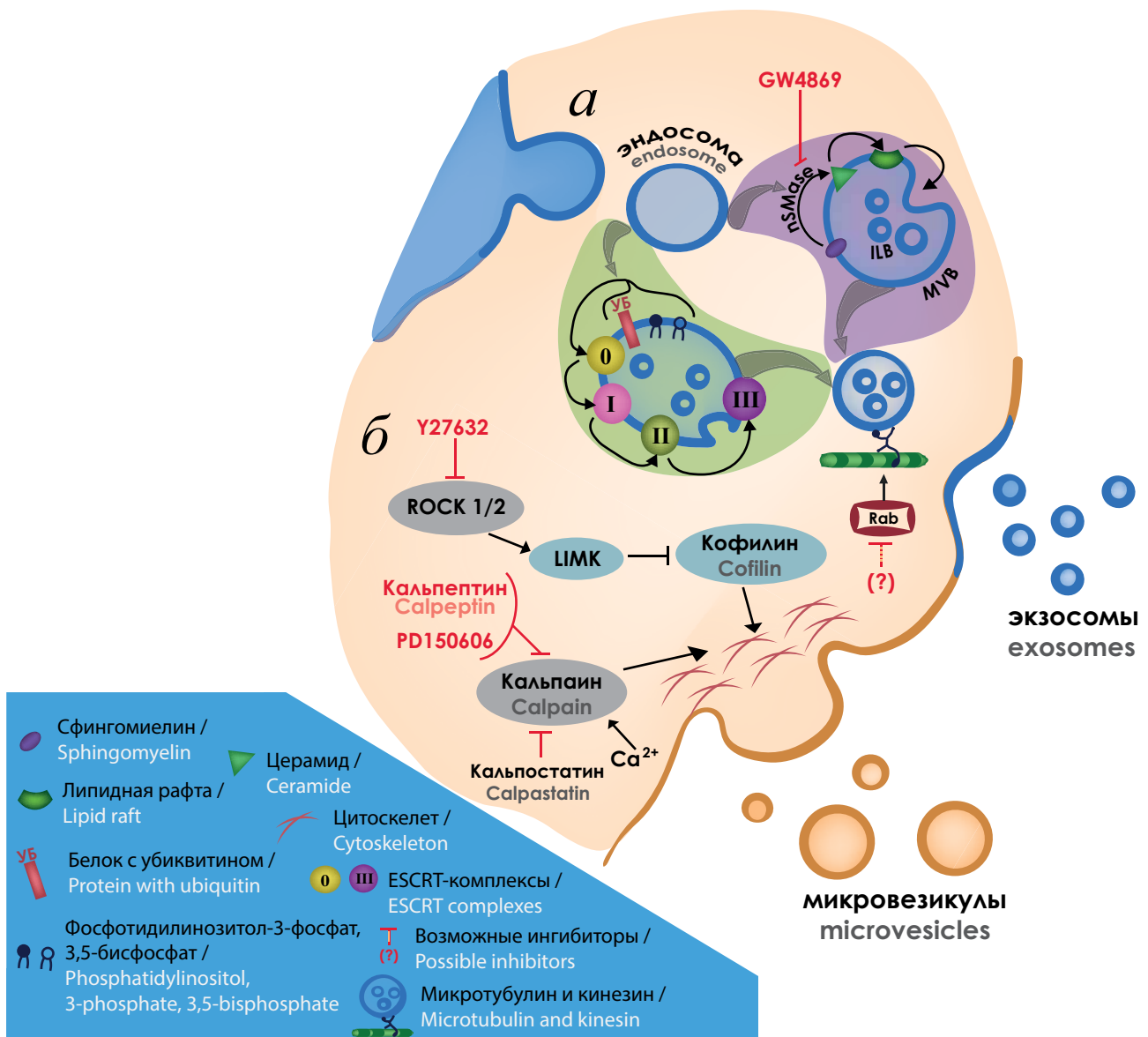


Рис. 1. Биогенез внеклеточных везикул и ингибиторы, блокирующие на разных этапах сборку EVs: а — биогенез экзосом, ингибирование нейтральной сфингомиелазы и белки Rab, которые могут играть роль специфической мишени при меланоме кожи (зеленым выделением обозначен ESCRT-зависимый путь, фиолетовым — церамидзависимый путь); б — биогенез микровезикул, ингибиторы кальпаина и ROCK 1/2, приводящие к блокированию перестройки цитоскелета; LIM-киназа (LIMK) представляет собой актинсвязывающую киназу, которая фосфорилирует члены семейства кофилинов — группу белков, деполимеризующих актиновые филаменты

Fig. 1. Biogenesis of extracellular vesicles (EVs) and inhibitors blocking EVs assembly at different stages: а — biogenesis of exosomes, inhibition of neutral sphingomyelinase and Rab proteins, which may play a role of a specific target in skin melanoma (green highlighting indicates ESCRT-dependent pathway, purple indicates ceramide-dependent pathway); б — biogenesis of microvesicles, and inhibitors of calpain and ROCK 1/2 leading to blocking cytoskeleton rearrangement; LIM kinase (LIMK) is an actin-binding kinase that phosphorylates members of the cofilin family, a group of proteins that depolymerize actin filaments

что характерно и важно для развития меланомы [29], вызывают деградацию компонентов цитоскелета. Почкованию наружу способствует выведение фосфатидилсерина (PS) с помощью специфических транслоказ (флоппаза, скремблаза). По мере того, как цитоскелет локально распадается и становится более проходимым, цитозольные белки и генетический материал сортируются в просвете мембранного выпячивания. Для почкования также необходима инициация сигнального каскада ARF6 (ADP ribosylation factor 6 – фактор рибозилирования аденозиндифосфата 6) посредством активации и рекрутирования PLD/ERK (extracellular signal-regulated kinase – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами; phospholipase D – фосфолипазы D) и фосфорилирования MLCK (Myosin Light-Chain Kinase – киназа легкой цепи миозина), что вызывает сокращение актомиозина и отщепление MB [10].

Ингибиторы кальпаина

Ингибиторы одной из цитозольных цистеиновых кальцийзависимых протеаз (кальпаина) используются во многих работах для подавления секреции MB, например, предварительная обработка тромбоцитов кальпептином существенно ингибировала образование MB (снижение на 70 %) [30–32]. Предполагается, что участие кальпаина в ремоделировании цитоскелета играет важную роль при формировании MB, однако точный механизм влияния кальпаинов на синтез MB пока неизвестен.

При повышении уровня кальция кальпаин активируется (во многом с помощью ко-активаторов) и далее может взаимодействовать с многочисленными белковыми субстратами [33]. Кальпаин-опосредованный протеолиз участвует в таких процессах как клеточная адгезия, миграция клеток, пролиферация и апоптоз, способствует ангиогенезу [34–37].

В настоящий момент у человека выявлено примерно 15 изоформ данного белка [38, 39], но не все из них функционируют как активная протеаза (в частности, кальпаин 6 неклассический). Показано, что экспрессия главных кальпаинов (m- и μ -кальпаины) повышена в злокачественных клетках человека [40, 41].

Ингибиторы кальпаина делятся на пептидные и непептидные соединения. Пептидные ингибиторы из-за действия через активный центр не обладают достаточной селективностью, блокируя действие и других цистеиновых протеаз (к которым в том числе относятся каспазы и катепсины, играющие большую роль в апоптозе). Именно неселективность пептидных ингибиторов и плохие показатели фармакокинетики ограничивают их терапевтический потенциал.

Непептидные ингибиторы обеспечивают большую специфичность против кальпаинов, взаимодействуя через аллостерические сайты. Но даже в случае

специфического ингибирования кальпаина из-за его плейотропной роли мы можем столкнуться с более сложной реакцией клеток, чем изолированное снижение выделяемых MB. Например, рядом исследований выявлена проапоптотическая роль кальпаина при лекарственно индуцированном апоптозе в культуре клеток меланомы. Ингибирование активности кальпаина PD150606 или кальпептином частично блокировало активацию каспаз-4 и -7 и апоптоз, индуцированный цисплатином и адриамицином [42].

Активация каспаз-4 и -7, по-видимому, опосредовалась активностью кальпаина, поскольку она блокировалась ингибиторами кальпаина кальпептином и PD150606, даже когда GRP78 (главный ингибитор активации каспаз-4 и -7) ингибировался siRNA.

Выяснено, что активация кальпаина является ранним и решающим событием в механизме апоптоза, о чем свидетельствует значительная защита от гибели клеток в образцах меланомы, обработанных ингибиторами кальпаина, MDL28170, кальпептином и PD150606, где наблюдается переменное, но значительное снижение активности каспаз-3, -7 [43, 44].

Ингибиторы кальпаинов (MDL28170 и кальпептин) экзогенно стимулируют аутофагию в клетках меланомы, которая может функционировать как благоприятная реакция на стресс, препятствующая механизмам клеточной смерти, индуцируемым цисплатином [45]. Однако не следует забывать о том, что при неоплазии аутофагия может быть как про-, так и антиопухолевой в зависимости от конкретной ткани и стадии опухоли [46]. Доступные в настоящее время данные о меланоме подтверждают как защитные, так и противоопухолевые свойства. Например, кальпаинзависимый клиренс белка аутофагии p62/SQSTM1 (играет решающую роль в качестве фактора сборки убиквитинированных белков и органелл и в конечном итоге разрушается в результате аутофагии) вносит вклад в онколитическую активность вируса Δ PK при меланоме [47].

В культуре клеток меланомы кожи, помимо всеобъемлюще синтезирующихся кальпаинов (m- и μ -кальпаины, кальпаины 14, 7 и др.), найден мышечно-специфический кальпаин 3 и два его варианта сплайсинга (hMr78 и hMr84). Рассматривается проапоптотическая роль тканеспецифического кальпаина 3 и его 2 нестабильных изоформ, чему соответствует понижение экспрессии изоформ кальпаина 3 при сравнении биоптатов доброкачественных невусов с неоплазиями разной степени злокачественности, обладающих соответствующей устойчивостью к апоптозу [39]. Так, в моделях со сверхэкспрессией одного из вариантов сплайсинга кальпаина 3 меланомы (hMr84) последовательно увеличивалась внутриклеточная продукция активных форм кислорода, которая приводила к окислительной модификации фосфолипидов

(образованию F2-изопростанов) и повреждению ДНК. Такие события приводили к неблагоприятной судьбе клеток, на что указывает снижение клеточной пролиферации и клеточная гибель [48].

В итоге на данный момент трудно оценить, играет ли повышенная экспрессия вариантов кальпаина 3, наблюдаемая во все еще жизнеспособных клетках, роль в поддержании или противодействии механизму апоптоза. Функции кальпаина 3 и его взаимодействие с главными кальпаинами (μ - и m -изоформы) рождает множество теорий, например о существовании «сети кальпаинов», которая представляет собой перекрестное взаимодействие между кальпаином 3 и m -, μ -изоформами. Кроме того, в клетках скелетных мышц ряд цитоскелетных и миофибриллярных белков, β -катенин, I κ B α , компоненты системы синтеза белка и кальпаистатин были идентифицированы как протеолитические субстраты кальпаина 3 [39]. Внутриклеточное распределение вариантов кальпаина 3 в цитоплазме и ядрышках позволяет предположить, что их роль может определять пространственное расположение в клетке.

Обработка клеток меланомы A7 кальпептином приводила к снижению выработки филамина А, который опосредует клеточную сигнализацию и транспортирует факторы транскрипции в клеточное ядро. Расщепление филамина А кальпаином приводит к ремоделированию цитоскелета и увеличению подвижности клеток меланомы [49]. Клетки через 16 ч после обработки кальпептином демонстрировали нарушение пролиферации на 86,5 % ($p < 0,01$), миграции на 82,1 % ($p < 0,01$) и образования колоний [50].

Недавно исследователи продемонстрировали, что клетки меланомы способны переключаться между мезенхимальной и амeboидной подвижностью: клетки меланомы перемещаются мезенхимально в ответ на провоспалительные цитокины, тогда как после экспрессии эмбрионального рецептора EphA2 они приобретают амeboидный стиль подвижности, приводящий к метастатическому распространению [50]. На клетках меланомы, сверхэкспрессирующих EphA2 или RacN17 (имитация первых шагов к мезенхимально-амeboидному переходу), показана способность кальпептина активировать малую ГТФазу RhoA, передающую сигналы, приводящие к повышению сократительной способности актомиозина, необходимой для амeboидного движения [51]. В дальнейшем были синтезированы ингибиторы Rho-ассоциированных ГТФаз, о которых будет сказано ниже.

Система «кальпаин – кальпаистатин» играет противоположные роли в росте и метастатической диссеминации меланомы. Это было доказано путем сравнения подкожно имплантируемых меланом B16F10 в контрольной мыши и генномодифицированной модели, сверхэкспрессирующей кальпаистатин (есте-

ственный и специфичный негативный регулятор кальпаина).

На 16-й день наблюдалась тенденция к снижению массы опухоли, плотности сосудов в мышечной модели со сверхэкспрессией кальпаистатина по сравнению с контролем ($1,7 \pm 0,3$ г против $3,2 \pm 0,8$ г; $9,2 \pm 0,5$ против $12,2 \pm 1,4$ сосуда/HPF; $p = 0,06$). Инфильтрат CD3 был значительно снижен у мышечной модели со сверхэкспрессией кальпаистатина ($p = 0,03$). Кроме того, у трансгенных вариантов рекрутирование CD4⁺ и NK-клеток было значительно снижено ($p = 0,02$ и $p = 0,004$ соответственно), и снижение количества CD8-клеток в этой группе было особенно заметным ($0,7 \pm 0,1$ против $5,2 \pm 1,5$ клетки/HPF; $p = 0,0003$).

Полученные данные демонстрируют, что ингибирование кальпаина фактически увеличивает диссеминацию меланомы, главным образом за счет уменьшения апоптоза и увеличения подвижности клеток меланомы при заметном ограничении инфильтрации иммунных клеток в опухолевую нишу [52]. Такие противоположные эффекты могут быть объяснены различной ролью кальпаинов в ОК и здоровых специализированных клетках.

Таким образом, в настоящее время применение даже специфичных непептидных ингибиторов кальпаина приводит к сложным фенотипическим изменениям, которые не имеют однозначного противоопухолевого эффекта в отношении меланомы кожи. Кальпаины участвуют в цисплатин- и адриамицин-индуцированном апоптозе, амeboидной трансформации, ингибируют защитную аутофагию, играют важную роль в метастазировании [53]. В свою очередь, многогранный функционал кальпаинов приводит к довольно парадоксальным фенотипическим последствиям его ингибирования, например, может ограничивать рост меланомы, васкуляризацию и инфильтрацию иммунными клетками, но парадоксальным образом усиливать ее распространение в регионарные ЛУ [50].

Перед внедрением ингибиторов кальпаинов в клинику к тому же стоит проблема возможных побочных эффектов, которые продемонстрированы в опытах по нокаутированию генов кальпаина 1 и 2, где в зависимости от нокаутированного кальпаина могла проявиться дисфункция тромбоцитов или вовсе нежизнеспособность с эмбриональной стадией [54–56].

Необходимо продолжить изучать связь между образованием МВ и активацией кальпаинов разных типов для выявления новых мишеней, намного меньше задействованных в фундаментальных процессах и имеющих тканеспецифичные формы (в частности, специфичные Rab-белки, участвующие в транспорте мультивезикулярных телец), а также рассматривать применение регуляторных РНК для специфичной блокировки.

Ингибирование Rho-ассоциированных протеинкиназ

Rho-ассоциированная протеинкиназа (ROCK) играет решающую роль в пролиферации и миграции различных типов клеток, воздействуя на цитоскелет [11].

Ранее сообщалось, что ингибитор ROCK Y-27632 ингибирует рост клеток меланомы мышинных моделей. Однако обнаружено, что ингибиторы ROCK способствуют росту и миграции клеток меланомы человека *in vitro*. В итоге Y-27632 усиливал рост и миграцию клеток меланомы с BRAF-мутацией, но оказывал негативное влияние на клетки меланомы дикого типа или первичные меланоциты [57]. Следовательно, действие ингибитора ROCK на клетки меланомы зависит от клеточного контекста, и применение ингибитора ROCK при лечении меланомы требует дальнейшего изучения.

Влияние на секретируемые EVs

Помимо ингибиторов сборки и секреции EVs, в будущем арсенал анти-EVs-терапии могут пополнить препараты, прерывающие EVs-коммуникацию на последующих уровнях передачи информации с помощью EVs (рис. 2). Выделенные EVs меланомы кожи имеют множество маркеров, связанных с их происхождением, которые можно использовать как таргетные мишени [58].

Первые экспериментальные попытки блокирования EVs опухоли осуществлялись с помощью моноклональных АТ (МкАТ), направленных на характерные для любых EVs человека поверхностные маркеры [10]. Например, на трансмембранные белки тетраспанины (CD63, CD81, CD9), участвующие в сортировке груза в EVs (причем и в экзосомы, и, предположительно, в МВ) и слиянии везикул с клеткой-реципиентом.

N. Nishida-Aoki и соавт. оценили влияние анти-CD9- и анти-CD63-АТ на мышиную модель ксенотрансплантата метастатического рака молочной железы. АТ против тетраспанинов вводили внутривенно в количестве 45 мкг/мышь 3 раза (6, 9, 12-й дни после имплантации опухоли). По истечении 35-дневного наблюдения и дальнейшей диссекции не выявлено статистически значимых различий в размерах первичной опухоли у мышей, получавших лечение анти-CD9 или анти-CD63, по сравнению с мышами в контрольных группах. Во время лечения не наблюдалось значительного снижения массы тела, что позволяет предположить, что АТ не вызывали побочных эффектов у мышей. Уровни плотности кровеносных сосудов в опухолевой ткани мышей, получавших лечение АТ против CD9, были такими же, как и в контрольной опухолевой ткани, тогда как плотность сосудов в экспериментальной группе

с применением АТ против CD63 была даже незначительно увеличена [59].

После 35 дней от момента имплантации были найдены и оценены метастатические клетки в мышинной модели, с помощью которых было выяснено, что применение АТ к CD63 приводило к низкой частоте метастазирования, а АТ к CD9 в меньшей степени, но все же снижало образование метастазов. Количество метастатических очагов было значительно снижено у мышей, получавших как анти-CD9, так и анти-CD63. Дополнительно была проверена зависимость между количеством опухолевых EVs и терапией. Результаты свидетельствуют о том, что, по крайней мере, АТ против CD63 снижало количество EVs, накапливающихся в органах мышей [59].

Несмотря на значительное угнетение метастазирования, необходимо понимать, что данное исследование проводилось на мышинной модели с прививаемой человеческой опухолью. Следовательно, применение АТ к тетраспанинам, характерным для всех EVs человека, как ни странно, имеет большой успех в лечении мышинной модели, однако в случае терапии человека способно привести к катастрофическим последствиям. Необходимо искать специфичные мишени для EVs опухоли человека.

Подобная попытка использовать тетраспанины EVs опухоли в качестве мишени и тем самым прервать EVs-коммуникацию была предпринята M.F. Santos и соавт. Они разработали моновалентное Fab-АТ, направленное против тетраспанина CD9 человека, и продемонстрировали его эффективность в блокировании интернализации EV, полученных из клеток меланомы, и ядерного переноса их грузовых белков в клетки-реципиенты. Далее научная группа продемонстрировала действие синтезированного АТ на модели колоректального рака (SW480/SW620). Моновалентное Fab-АТ против CD9 предотвращало транспорт EVs из клеток SW620 в SW480, тем самым ингибируя их фенотипическую трансформацию [60], но и в этом случае применение подобного АТ ограничено неспецифичностью мишени.

Удивительно, но в качестве возможной специфичной мишени многих опухолевых EVs рассматривают семейство белков теплового шока А (HSPA, включает 12 высококонсервативных молекулярных белков-шаперонов). Важно отметить, что HSPA и другие HSP (например, HSPC2/HSP90AB1 или HSP27) были указаны в качестве конститутивных EVs-белков. При этом мембранная локализация индуцированного стрессом HSPA/HSP70 специфична только для EVs опухолевого происхождения и была предложена в качестве потенциального биомаркера диагностики или лечения [61, 62]. Однако значение HSPAs в EVs-опосредованной коммуникации пока не до конца известно [63].

На будущие способы доставки нанотерапевтических средств и эффективность уже существующих методов контроля секретируемых EVs опухоли могут повлиять фундаментальные исследования, изучающие механизмы их транспорта в межклеточном пространстве (см. рис. 2, б). Например, на модельной линии клеток рака молочной железы было

показано, что не только конвекция межклеточной жидкости влияет на транспорт, но и связывание EVs с внеклеточным матриксом [64]. К тому же P.A. Sariano и соавт. продемонстрировали возрастающее присутствие ламининсвязывающих интегринов $\alpha 3 \beta 1$ и $\alpha 6 \beta 1$ в EVs по мере увеличения злокачественного потенциала клеток, что может говорить об увеличении

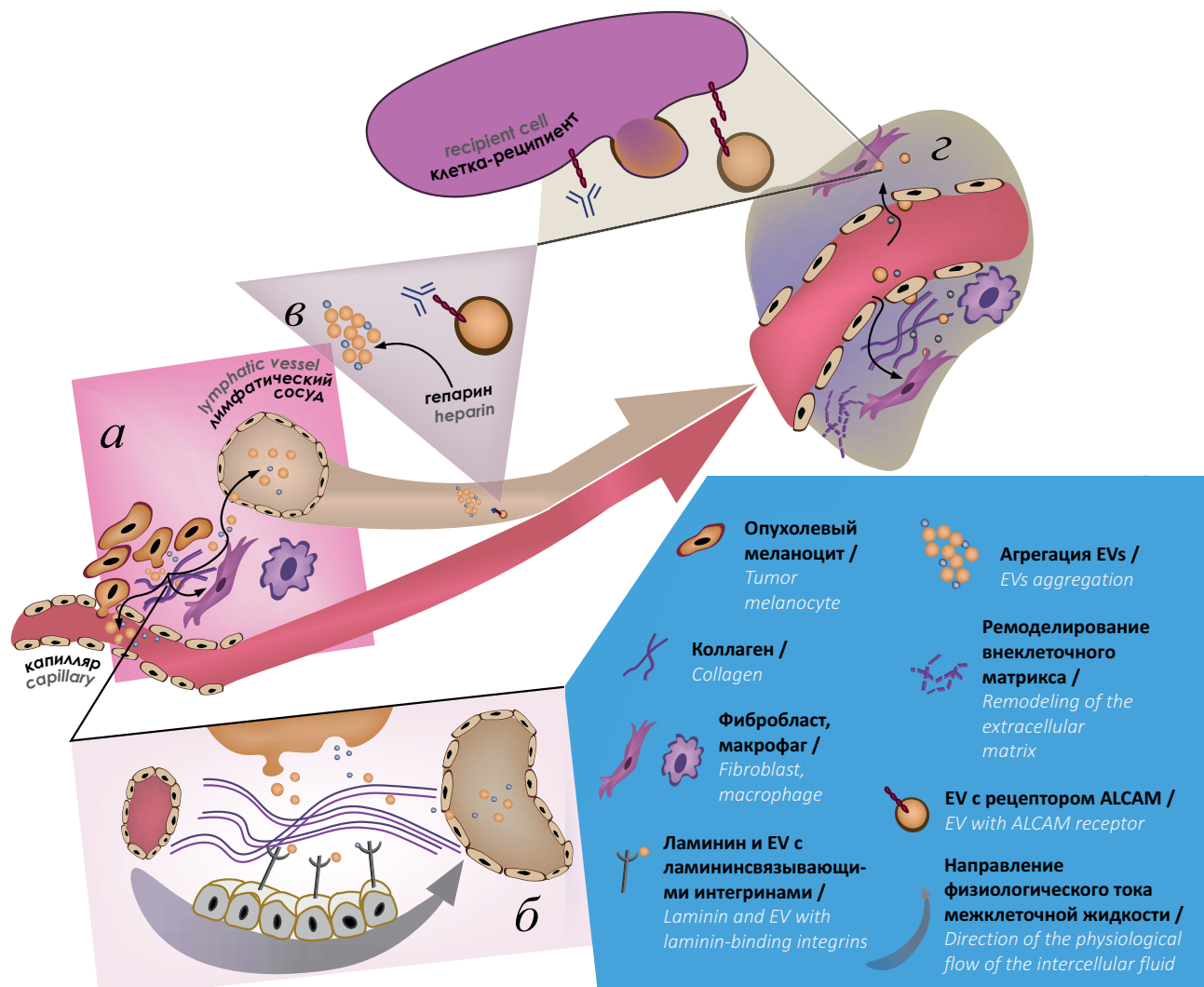


Рис. 2. Транспорт внеклеточных везикул (EVs) от места образования до конечной мишени и способы влияния на секретируемые EVs: а – векторы перемещения выделяемых опухолевой клеткой EVs; б – особенности транспорта EVs в межклеточном пространстве опухоли: часть EVs, имеющих ламининсвязывающие интегрин, остается в структуре внеклеточного матрикса, несвязанная когорта EVs перемещается по направлению физиологического тока межклеточной жидкости; в – имеющиеся способы влияния на секретируемые EVs; з – блокирование специфического слияния EVs с клеткой-мишенью и подготовка метастатической ниши в случае успешной EVs-коммуникации (за счет ремоделирования внеклеточного матрикса, увеличения проницаемости сосудов, рекрутирования иммунных клеток и активации фибробластов); ALCAM – рецептор, позволяющий EVs специфично сливаться с клеткой-реципиентом. Блокирование данного рецептора как на мембране клетки-реципиента, так и на EVs с помощью моноклональных антител приводит к частичному нарушению EVs-коммуникации

Fig. 2. Transport of extracellular vesicles (EVs) from the place of formation to the final target and ways of influence on secreted EVs: a – vectors of movement of EVs secreted by a tumor cell; б – features of extracellular vesicle transport in the tumor intercellular space: part of EVs having laminin-binding integrins remains in the structure of the extracellular matrix, the unbound cohort of EVs moves along the direction of physiological intercellular fluid flow; в – available ways to influence secreted EVs; з – blocking the specific fusion of EVs with the target cell and preparing the metastatic niche in case of successful EVs-communication (by remodeling the extracellular matrix, increasing vascular permeability, recruiting immune cells and activating fibroblasts); ALCAM is a receptor that allows EVs to specifically fuse with the recipient cell. Blocking this receptor both on the membrane of the recipient cell and on EVs using monoclonal antibodies leads to partial disruption of EVs-communication

интенсивности изменений в микроокружении опухоли по мере опухолевой прогрессии.

Протеом EVs из-за сложности селективного выделения везикул до сих пор пополняется новыми данными, для ознакомления с протеомным анализом и его результатами в изучении EVs меланомы рекомендуется обзор M. Surman и соавт. [65].

Предотвращение взаимодействия EVs с клеткой-реципиентом

Последним важным звеном в EVs-коммуникации является взаимодействие с клеткой-мишенью, блокирование передачи информации на данном уровне — тоже перспективное направление анти-EVs-терапии. Так, замечена способность гепарина влиять на поглощение EVs опухолевого, а также неопухолевого происхождения клетками-реципиентами (см. рис. 2, в) [66]. Инкубация EVs, полученных из клеток глиомы, с гепарином привела к образованию структур, наблюдаемых с помощью просвечивающей электронной микроскопии, причем EVs четко видны внутри этих структур. Включение гепарина значительно уменьшало перенос меченных EVs к клеткам-мишеням [67]. Способность опосредовать взаимодействие между клетками и EVs также выявлена у низкомолекулярных гепаринов и гепариноидов [68, 69].

Как уже сказано в самом начале обзора, EVs способны подготавливать нишу для метастазирования. Подобные механизмы в метастазировании меланомы обнаружены не только в ЛУ [58], но и в головном мозге. Ученые идентифицировали рецепторы, участвующие в интернализации экзосом (полученных из линии клеток опухоли с метастазами в мозг, SK-Mel-28), в эндотелиальные клетки ГЭБ человека (клетки hCMEC/D3). Смесь нейтрализующих АТ против интегринов $\alpha 5$ и αV снижала поглощение экзосомы на 11,8 %, в то время как применение малых интерферирующих РНК CD46 снижало его на 39,0 %. Иммуногистохимический анализ подтвердил присутствие CD46 в эндотелиальных клетках капилляров головного мозга человека. Эти результаты позволяют предположить, что CD46 является основным рецептором для поглощения экзосом, полученных из SK-Mel-28, эндотелиальными клетками ГЭБ человека (клетками hCMEC/D3) [70]. Ограничивающим фактором данной стратегии является не только существование и других рецепторных систем, приводящих к слиянию EV с клеткой-реципиентом, но и иные механизмы влияния EVs на клетку-мишень: взаимодействие между специфичными EVs-белками, которые могут быть даже отщеплены от везикулы, и рецепторами клетки с дальнейшей активацией вторичных мессенджеров, фагоцитоз и интернализация целой везикулы [71].

Еще одним примером обнаруженной адгезивной молекулы, обеспечивающей специфическое погло-

щение EVs опухолью клеткой-реципиентом, может служить ALCAM/CD166 (activated leukocyte cell adhesion molecule — молекула адгезии активированных лейкоцитарных клеток). Данная молекула способствует стимулирующей роли EVs при метастазировании колоректального рака и рака яичников в брюшину [72]. АТ к ALCAM ухудшали поглощение EVs (см. рис. 2, в). С помощью нокаута гена ALCAM системой редактирования CRISPR-Cas9 в клетках доноров и реципиентах, а также оценки адгезии EVs с последними было выяснено, что ALCAM способна как к гомофильным взаимодействиям ALCAM — ALCAM, так и к гетерофильным, связываясь с альтернативными лигандами (см. рис. 2, г).

Рецепторные системы, обеспечивающие специфичное слияние EVs, на самом деле, имеют множество адгезивных молекул. Например, в описанном ранее исследовании дополнительно подтвердили результаты предыдущих отчетов, указывающих на то, что $\beta 1$ -интегрины также участвуют в процессах слияния EVs с клеткой-реципиентом. В других публикациях освещается множество адгезивных молекул, принадлежащих к семейству интегринов, иммуноглобулинов и селектинов, а также CD44 и тетраспанинов [73–76].

Заключение

Блокируя EVs-коммуникацию на разных ее этапах, возможно предотвращать или отдалять развитие резистентности меланомы кожи к ЛТ, метастазирование и пролиферацию ОК.

Влияние на сборку и секрецию EVs одновременно является и самым радикальным методом вмешательства и при этом наиболее эффективным. Как оказалось, многие применяемые ингибиторы синтеза EVs в качестве мишеней используют multifunctional элементы внутриклеточной регуляции, большая часть из которых давно имеет статус потенциальной мишени даже без своего влияния на синтез EVs (например, система «кальпостатин — кальпаин»). Однако применение некоторых распространенных в фундаментальных исследованиях соединений имеет большие риски из-за неоднозначного или парадоксального действия на опухоль *in vivo* (ингибиторы кальпаина, Y-27632).

Несмотря на сложность вмешательства в фундаментальные процессы клетки, сейчас есть удачные исследования применения НЭ с GW4869 в лечении меланомы кожи мышинных моделей, которые показали преимущество перед классической терапией ИКТИ. Между тем даже здесь есть нюансы, связанные с церамидной регуляцией тонуса сосудов и действием на нейросинаптическую передачу.

Стоит учесть то, что даже молекулярные участники фундаментальных процессов могут иметь

тканеспецифичные формы, подходящие для таргетного воздействия. В случае меланомы такими слабыми звеньями синтеза EVs могут являться небольшие Rab-ГТФазы (например, RAB27A, RAB27B и RAB1).

В случае опасности применения ингибиторов синтеза EVs вследствие их неоправданного системного цитопатического действия с развитием серьезных побочных эффектов нам остается опсонизировать уже выделившиеся EVs или блокировать их взаимодействие с клеткой-реципиентом. Есть интересные исследования, показывающие перспективность опсонизации EVs-опухоли с последующим снижением риска метастазирования, однако в данных экспериментах используются неспецифичные для человеческого организма мишени. Необходимо выявить по имеющимся базам данных протеома EVs возможные мишени с дальнейшей разработкой чувствительных МКАТ. Помимо тактики опсонизации EVs рассматривается и блокировка рецепторов EVs, с помощью которых происходит контакт и слияние с клеткой-реципиентом (CD46 как предположительно основной рецептор экзосом для поглощения эндотелиальными клетками ГЭБ человека).

В данной работе проанализировано действие малых синтетических молекул, МКАТ и регуляторных РНК на разные звенья биогенеза EVs опухоли: сборку, секрецию EVs, а также их транспорт. Описываемое направление является актуальным для разработки таргетных препаратов и вакцин, применимых в лечении меланомы кожи и в особенности профилактики метастазирования. Вместе с тем остаются общие вопросы о нахождении баланса между эффективностью и специфичностью действия препарата. Кроме того, блокирование EVs-коммуникации на уровне сборки EVs имеет больше проблем, касающихся специфичности действия и возможных системных побочных эффектов, из-за схожести биохимических процессов и их участников в разных типах клеток. Однако и попытки воздействовать на освободившиеся EVs не в мышинной модели могут иметь более скромные результаты по причине большого количества EVs в системном кровотоке со схожими мишенями на поверхности. На фоне предыдущих уровней прерывания биогенеза опухолевых везикул крайне интересными являются исследования, посвященные нарушению взаимодействия EVs с клеткой-реципиентом и интернализации.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Yanfang L., Yan G., Xuetao C. The exosomes in tumor immunity. *OncoImmunology* 2015;4(9):6. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1027472
2. Yang Q., Xu J., Gu J. et al. Extracellular vesicles in cancer drug resistance: Roles, mechanisms, and implications. *Adv Sci (Weinh)* 2022;9(34):e2201609. DOI: 10.1002/advs.202201609
3. Tucci M., Mannavola F., Passarelli A. et al. Exosomes in melanoma: A role in tumor progression, metastasis and impaired immune system activity. *Oncotarget* 2018;9(29):20826–37. DOI: 10.18632/oncotarget.24846
4. Samireh J., Ephraim A.A., Sharad K. et al. Inhibition of microvesiculation sensitizes prostate cancer cells to chemotherapy and reduces docetaxel dose required to limit tumor growth *in vivo*. *Sci Rep* 2015;5(2):13. DOI: 10.1038/srep13006
5. Kosaka N., Iguchi H., Hagiwara K. et al. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *J Biol Chem* 2013;288(15):10849–59. DOI: 10.1074/jbc.M112.446831
6. Brinton L.T., Sloane H.S., Kester M. et al. Formation and role of exosomes in cancer. *Cell Mol Life Sci* 2015;72(4):659–71. DOI: 10.1007/s00018-014-1764-3
7. Kilinc S., Paisner R., Camarda R. et al. Oncogene regulated release of extracellular vesicles. *Dev Cell* 2021;56(13):1989–2006. DOI: 10.1016/j.devcel.2021.05.014
8. Poggio M., Hu T., Chien-Chun P. et al. Suppression of exosomal PD-L1 induces systemic anti-tumor immunity and memory. *Cell* 2019;177(2):414–27. DOI: 10.1016/j.cell.2019.02.016
9. Namee N.M., Catalano M., Mukhopadhyaya A. et al. An extensive study of potential inhibitors of extracellular vesicles release in triple-negative breast cancer. *BMC Cancer* 2023;23(654):12. DOI: 10.1186/s12885-023-11160-2
10. Kalra H., Gregor P.C., Mathivanan D. et al. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. *Mol Sci* 2016;17(2):170. DOI: 10.3390/ijms17020170
11. Catalano M., O'Driscoll L. Inhibiting extracellular vesicles formation and release: A review of EV inhibitors. *Extracell* 2019;9(1):22. DOI: 10.1080/20013078.2019.1703244
12. Matsumoto A., Takahashi Y., Nishikawa M. et al. Accelerated growth of B16BL6 tumor in mice through efficient uptake of their own exosomes by B16BL6 cells. *Cancer Sci* 2017;108(9):1803–10. DOI: 10.1111/cas.13310
13. Wang G., Xie L., Li B. et al. A nanounit strategy reverses immune suppression of exosomal PD-L1 and is associated with enhanced ferroptosis. *Nat Commun* 2021;12(1):12. DOI: 10.1038/s41467-021-25990-w
14. Van Niel G., D'Angelo G., Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Mol Cell Biol* 2018;19(4):213–28. DOI: 10.1038/nrm.2017.125
15. SenthilKumar G., Katunaric B., Zirgibel Z. et al. Necessary role of acute ceramide formation in the human microvascular endothelium during health and disease. *bioRxiv* 2023;1(1):34. DOI: 10.1101/2023.06.02.543341
16. Wheeler D., Knapp E., Bandaru V.R. TNF α -induced neutral sphingomyelinase-2 modulates synaptic plasticity by controlling the membrane insertion of NMDA receptors. *J Neurochem* 2009;109(5):1237–49. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.06038.x
17. Tabatadze N., Savonenko A., Song H. Inhibition of neutral sphingomyelinase-2 perturbs brain sphingolipid balance and spatial memory in mice. *J Neurosci Res* 2010;88(13):2940–51. DOI: 10.1002/jnr.2243818
18. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10(8):513–25. DOI: 10.1038/nrm2728

19. Savina A., Vidal M., Colombo M. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci* 2002;115(12):2505–15. DOI: 10.1242/jcs.115.12.2505
20. Peinado H., Aleckovic M., Lavotshkin S. et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 2012;18(6):883–91. DOI: 10.1038/nm.2753
21. Bahadoran P., Aberdam E., Mantoux F. Rab27a: A key to melanosome transport in human melanocytes. *J Cell Biol* 2001;152(4):843–50. DOI: 10.1083/jcb.152.4.84322
22. Guo D., Lui G.Y.L., Lai S.L. et al. RAB27A promotes melanoma cell invasion and metastasis via regulation of pro-invasive exosomes. *Int J Cancer* 2019;144(12):3070–85. DOI:10.1002/ijc.32064
23. Ostrowski M., Carmo N.B., Krumeich S. et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* 2010;12(1):19–30. DOI: 10.1038/ncb2000
24. Poste G., Nicolson G.L. Arrest and metastasis of blood-borne tumor cells are modified by fusion of plasma membrane vesicles from highly metastatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77(1):399–403. DOI: 10.1073/pnas.77.1.399
25. Liao C.F., Lin S.H., Chen H.C. et al. CSE1L, a novel microvesicle membrane protein, mediates Ras-triggered microvesicle generation and metastasis of tumor cells. *Mol Med* 2012;18(1):1269–80. DOI: 10.2119/molmed.2012.00205
26. Clancy J.W., Sedgwick A., Rosse C. et al. Regulated delivery of molecular cargo to invasive tumor-derived microvesicles. *Nat Commun* 2015;21(6):21. DOI: 10.1038/ncomms7919
27. Zhao X.P., Wang M., Song Y. Membrane microvesicles as mediators for melanoma-fibroblasts communication: Roles of the VCAM-1/VLA-4 axis and the ERK1/2 signal pathway. *Cancer Lett* 2015;360(2):125–33. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.01.032
28. Martinez-Lorenzo M.J., Anel A., Alava M.A. et al. The human melanoma cell line MeJuSo secretes bioactive FasL and APO2L/TRAIL on the surface of microvesicles. Possible contribution to tumor counterattack. *Cell Res* 2004;295(2):315–29. DOI: 10.1016/j.yexcr.2003.12.024
29. Haoran Z., Zhe C., Aijun Z. et al. The role of calcium signaling in melanoma. *Int J Mol Sci* 2022;23(3):17. DOI: 10.3390/ijms23031010
30. Fox J.E., Austin C.D., Reynolds C.C. et al. Evidence that agonist-induced activation of calpain causes the shedding of procoagulant-containing microvesicles from the membrane of aggregating platelets. *Biol Chem* 1991;266(20):13289–95. PMID: 2071604
31. Smith P.A., Fitzsimons J.T., Loker J.E. et al. 5-hydroxytryptamine as a possible inhibitory neurotransmitter in the central nervous system of the leech, *Haemaphys sanguisuga*. *Comp Biochem Physiol* 1975;52(1):65–73. DOI: 10.1016/0306-4492(75)90015-5
32. Yano Y., Shiba E., Kambayashi J. et al. The effects of calpeptin (a calpain specific inhibitor) on agonist induced microparticle formation from the platelet plasma membrane. *Thromb Res* 1993;71(5):385–96. DOI: 10.1016/0049-3848(93)90163-I
33. Siklos M., BenAissa M., Thatcher G.R. Cysteine proteases as therapeutic targets: Does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharm Sin* 2015;5(6):506–19. DOI: 10.1016/j.apsb.2015.08.001
34. Letavernier B., Zafrani B., Nassar D. et al. Calpains contribute to vascular repair in rapidly progressive form of glomerulonephritis: potential role of their externalization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(2):335–42. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.240242
35. Hua T., Robitaille M., Roberts-Thomson S.J. et al. The intersection between cysteine proteases, Ca²⁺ signalling and cancer cell apoptosis. *Biochim Biophys Mol Cell Res* 2023;1870(7):13. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2023.119532
36. Youn J.-Y., Wang T., Cai H. An ezrin/calpain/PI3K/AMPK/eNOS1179 signaling cascade mediating VEGF-dependent endothelial nitric oxide production. *Circ Res* 2009;104(1):50–9. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.178467
37. Dewitt S., Hallett M. Leukocyte membrane “expansion”: A central mechanism for leukocyte extravasation. *J Leukoc Biol* 2007;81(5):1160–4. DOI: 10.1189/jlb.1106710
38. Sorimachi H., Hata S., Ono Y. Calpain chronicle – an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2011;87(6):287–327. DOI: 10.2183/pjab.87.287
39. Spinozzi S., Albini S., Best H., Richard I. Calpains for dummies: What you need to know about the calpain family. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 2021;1869(5):44. DOI: 10.1016/j.bbapap.2021.140616
40. Shiba E., Kambayashi J.I., Sakon M. et al. Ca²⁺-dependent neutral protease (calpain) activity in breast cancer tissue and estrogen receptor status. *Breast Cancer* 1996;3(1):13–7. DOI: 10.1007/BF02966957
41. Moretti D., Del Bello B., Cosci E. et al. Novel variants of muscle calpain 3 identified in human melanoma cells: Cisplatin-induced changes *in vitro* and differential expression in melanocytic lesions. *Carcinogenesis* 2009;30(6):960–7. DOI: 10.1093/carcin/bgp098
42. Jiang C., Mao Z.G., Kelly A.A.-K. et al. Glucose-regulated protein 78 antagonizes cisplatin and adriamycin in human melanoma cells. *Carcinogenesis* 2009;30(2):197–204. DOI: 10.1093/carcin/bgn220
43. Del Bello B., Moretti D., Gamberucci A. et al. Cross-talk between calpain and caspase-3/-7 in cisplatin-induced apoptosis of melanoma cells: A major role of calpain inhibition in cell death protection and p53 status. *Oncogene* 2007;26(19):2717–26. DOI: 10.1038/sj.onc.1210079
44. Mandic A., Viktorsson K., Strandberg L. et al. Calpain-mediated bid cleavage and calpain-independent bak modulation: Two Separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002;22(9):3003–13. DOI: 10.1128/MCB.22.9.3003-3013.2002
45. Del Bello B., Toscano M., Moretti D. et al. Cisplatin-induced apoptosis inhibits autophagy, which acts as a pro-survival mechanism in human melanoma cells. *PLoS One* 2013;8(2):14. DOI: 10.1371/journal.pone.0057236
46. Rosenfeldt M.T., Ryan K.M. The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis* 2011;32(7):955–63. DOI: 10.1093/carcin/bgr031
47. Colunga A., Bollino D., Schech V. et al. Calpain-dependent clearance of the autophagy protein p62/SQSTM1 is a contributor to Δ PK oncolytic activity in melanoma. *Gene Therapy* 2014;21(4):371–8. DOI: 10.1038/gt.2014.6
48. Moretti D., Del Bello B., Allavena G. et al. Calpain-3 impairs cell proliferation and stimulates oxidative stress-mediated cell death in melanoma cells. *PLoS One* 2015;10(2):22. DOI: 10.1371/journal.pone.0117258
49. O’Connell M.P., Fiori J.L., Baugher K.M. et al. Wnt5A activates the calpain-mediated cleavage of filamin A. *J Invest Dermatol* 2009;129(7):1782–9. DOI: 10.1038/jid.2008.433
50. Salimi R., Bandaru S., Devarakonda S. et al. Blocking the cleavage of filamin A by calpain inhibitor decreases tumor cell growth. *Anticancer Res* 2018;38(4):2079–85. DOI:10.21873/anticancer.12447
51. Taddei M.L., Giannoni E., Morandi A. et al. Mesenchymal to amoeboid transition is associated with stem-like features of melanoma cells. *Cell Commun Signal* 2014;1(12):12. DOI: 10.1186/1478-811X-12-24
52. Raimbourg Q., Perez J., Vandermeersch S. et al. The calpain/calpastatin system has opposing roles in growth and metastatic dissemination of melanoma. *PLoS One* 2013;8(4):13. DOI: 10.1371/journal.pone.0060469
53. Chen J., Wu Y., Zhang L. et al. Evidence for calpains in cancer metastasis. *J Cell Physiol* 2019;234(6):8233–40. DOI: 10.1002/jcp.27649
54. Arthur J.S., Elce J.S., Hegadorn C. et al. Disruption of the murine calpain small subunit gene, *Capn4*: Calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division. *Mol Cell Biol* 2000;20(12):4474–81. DOI: 10.1128/MCB.20.12.4474-4481.2000

55. Azam M., Andrabi S.S., Sahr K.E. et al. Disruption of the mouse mu-calpain gene reveals an essential role in platelet function. *Mol Cell Biol* 2001;21(6):2213–20. DOI: 10.1128/MCB.21.6.2213-2220.2001
56. Dutt P., Croall D.E., Arthur J.S. et al. m-Calpain is required for preimplantation embryonic development in mice. *BMC Dev Biol* 2006;6(3):11. DOI: 10.1186/1471-213X-6-3
57. Chang F., Zhang Y., Mi J. et al. ROCK inhibitor enhances the growth and migration of BRAF-mutant skin melanoma cells. *Cancer Sci* 2018;109(11):3428–37. DOI: 10.1111/cas.13786
58. Leary N., Walser S., He Y. et al. Melanoma-derived extracellular vesicles mediate lymphatic remodelling and impair tumour immunity in draining lymph nodes. *J Extracell Vesicles* 2022;11(2):e12197. DOI: 10.1002/jev2.12197
59. Nishida-Aoki N., Tominaga N., Takeshita F. et al. Disruption of circulating extracellular vesicles as a novel therapeutic strategy against cancer metastasis. *Mol Ther* 2017;25(1):181–91. DOI: 10.1016/j.ymthe.2016.10.009
60. Santos M.F., Rappa G., Fontana S. et al. Anti-human CD9 fab fragment antibody blocks the extracellular vesicle-mediated increase in malignancy of colon cancer cells. *Cells* 2022;11(16):2474. DOI: 10.3390/cells11162474
61. Gobbo J., Marcion G., Cordonnier M. et al. Restoring anticancer immune response by targeting tumor-derived exosomes with a HSP70 peptide aptamer. *J Natl Cancer Inst* 2016;108(3). DOI: 10.1093/jnci/djv330
62. Chanteloup G., Cordonnier M., Isambert N. et al. Monitoring HSP70 exosomes in cancer patients' follow up: A clinical prospective pilot study. *J Extracell Vesicles* 2020;9(1): 1766192. DOI: 10.1080/20013078.2020.1766192
63. Sojka D.R., Abramowicz A., Adamiec-Organisciok M. et al. Heat shock protein A2 is a novel extracellular vesicle-associated protein. *Sci Rep* 2023;13(1):4734. DOI: 10.1038/s41598-023-31962-5
64. Sariano P.A., Mizenko R.R., Shirure V.S. et al. Convection and extracellular matrix binding control interstitial transport of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2023;12(4):e12323. DOI: 10.1002/jev2.12323
65. Surman M., Stępień E., Przybyło M. Melanoma-derived extracellular vesicles: Focus on their proteome. *Proteomes* 2019;7(2):21. DOI: 10.3390/proteomes7020021
66. Maguire C.A., Balaj L., Sivaraman S. et al. Microvesicle-associated AAV vector as a novel gene delivery system. *Mol Ther* 2012;20(5):960–71. DOI: 10.1038/mt.2011.303
67. Atai N.A., Balaj L., van Veen H. et al. Heparin blocks transfer of extracellular vesicles between donor and recipient cells. *J Neurooncol* 2013;115(3):343–51. DOI: 10.1007/s11060-013-1235-y
68. Gamperl H., Plattfaut C., Freund A. et al. Extracellular vesicles from malignant effusions induce tumor cell migration: inhibitory effect of LMWH tinzaparin. *Cell Biol Int* 2016;40(10):1050–61. DOI: 10.1002/cbin.10645
69. Manandhar S., Park J., Kothandan V.K. et al. Properties of heparinoids premixed with tumor-derived extracellular vesicles. *Bioconjug Chem* 2018;29(11):3757–67. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00637
70. Kuroda H., Tachikawa M., Yagi Y. et al. Cluster of differentiation 46 is the major receptor in human blood–brain barrier endothelial cells for uptake of exosomes derived from brain-metastatic melanoma cells (SK-Mel-28). *Mol Pharm* 2019;16(1):292–304. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00985
71. Украинская В.М., Рубцов Ю.П., Кнорре В.Д. и др. Везикулы, секретируемые опухолевыми клетками, и их роль в регуляции противоопухолевого иммунитета. *Acta Naturae* 2019;11(4):33–41. DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-33-41
72. Cardeñes B., Clares I., Bezoz T. et al. ALCAM/CD166 is involved in the binding and uptake of cancer-derived extracellular vesicles. *Int J Mol Sci* 2022;23(10):5753. DOI: 10.3390/ijms23105753
73. Kowal J., Tkach M., Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2014;2(1):116–25. DOI: 10.1016/j.ceb.2014.05.004
74. Willms E., Cabañas C., Mäger I. et al. Extracellular vesicle heterogeneity: subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression. *Front Immunol* 2018;9:738. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00738
75. Nazarenko I., Rana S., Baumann A. et al. Surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res* 2010;70(4):1668–78. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2470
76. Reyes R., Cardeñes B., Machado-Pineda Y., Cabañas C. Tetraspanin CD9: A key regulator of cell adhesion in the immune system. *Front Immunol* 2018;9:863. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00863

Вклад авторов

В.А. Шитиков: написание текста рукописи;
Е.Н. Кособокова: редактирование рукописи.

Author's contributions

V.A. Sheetikov: writing the text of the manuscript;
E.N. Kosobokova: editing the text of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.А. Шитиков / V.A. Sheetikov: <https://orcid.org/0009-0007-7520-3397>
Е.Н. Кособокова / E.N. Kosobokova: <https://orcid.org/0000-0002-4660-8519>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа была выполнена при финансовой поддержке Минздрава России в рамках исследования № 1022040600453-9-3.2.21;3.4.2.

Funding. The work was carried out with the financial support of the Ministry of Health of Russia in the framework of the research No 1022040600453-9-3.2.21;3.4.2.

Статья поступила: 25.11.2023. **Принята к публикации:** 26.02.2024.

Article received: 25.11.2023. **Accepted for publication:** 26.02.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-60-68>

Два типа иммунного микроокружения рака почки

А.А. Борунова¹, А.А. Алимов², И.Б. Шоуа¹, А.И. Черткова¹, З.Г. Кадагидзе¹, А.Ю. Кузеванова²,
Н.К. Жумабаев¹, Ф.М. Абдул¹, О.А. Халмурзаев¹, К.С. Немцева¹, А.В. Матвеев¹, П.В. Кононец¹,
В.Б. Матвеев¹, Т.Н. Заботина¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115552 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1

Контакты: Анна Анатольевна Борунова a.borunova@ronc.ru

Введение. Микроокружение опухоли может как сдерживать опухолевый рост, так и способствовать прогрессированию заболевания, поэтому исследование субпопуляционного состава опухолеинфильтрирующих лимфоцитов (tumor-infiltrating lymphocytes, TILs) является актуальной и значимой темой.

Цель исследования – охарактеризовать иммунное микроокружение рака почки методом проточной цитометрии.

Материалы и методы. В исследование включены кровь, опухолевая и нормальная ткань удаленной почки 32 пациентов со светлоклеточным почечным раком, получавших лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина. Ткань почки была получена при хирургическом удалении опухоли (резекции/нефрэктомии). Для анализа брали фрагмент опухоли и нормальной ткани под контролем морфолога. Кровь для исследования забирали в день операции. Иммунологическое исследование проводили методом проточной цитометрии. Ткань почки предварительно гомогенизировали и обрабатывали клеточную суспензию, как и периферическую кровь, моноклональными антителами к CD45, CD3, CD4, CD8, CD16⁺CD56⁺, CD19, CD28, CD279, CD11b, меченными различными флуорохромами.

Результаты. Т-лимфоциты и NK-клетки (естественные киллеры) имеют выраженную обратную корреляционную связь, что позволило выделить 2 ($n = 32$; 18/14) варианта иммунного микроокружения опухоли: Т-клеточный вариант с преобладанием CD3⁺CD8⁺-клеток над CD3⁺CD4⁺-лимфоцитами и NK-клеточный – увеличение количества NK-клеток при выраженном уменьшении доли Т-лимфоцитов за счет CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов. В основе двух вариантов лежит различие эффекторного звена – преобладание клеток врожденного (NK) или адаптивного (CD3⁺CD8⁺) иммунитета. Различались TILs иммунных профилей и по количеству CD8⁺PD1⁺-клеток – при Т-клеточном варианте их количество было в 2 раза больше, чем при NK-клеточном. Аналогичное распределение касалось и CD4⁺-Treg-клеток.

Заключение. Выявлено 2 иммунологически конкурентных варианта микроокружения опухоли почки – Т-клеточный, характеризующийся большей степенью выраженности инфильтрации и концентрацией Т-регуляторных клеток; NK-клеточный, с незначительной степенью инфильтрации и выраженным усилением эффекторного звена в ткани и провоспалительной активностью периферической крови.

Ключевые слова: TILs, NK-клетки, CD8⁺PD1⁺-клетки, рак почки, SII индекс

Для цитирования: Борунова А.А., Алимов А.А., Шоуа И.Б. и др. Два типа иммунного микроокружения рака почки. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(2):60–8.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-60-68>

The two types of immune microenvironment of renal cancer

Anna A. Borunova¹, Andrei A. Alimov², Iona B. Showa¹, Antonina I. Chertkova¹, Zaira G. Kadagidze¹, Anna Yu. Kuzevanova²,
Nurlan K. Zhumabaev¹, Farkhad M. Abdul¹, Oybek A. Khalmurzaev¹, Karolina S. Nemtseva¹, Aleksey V. Matveev¹,
Pavel V. Kononets¹, Vsevolod B. Matveev¹, Tatiana N. Zabotina¹

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

²Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechye St., Moscow 115522, Russia

Contacts: Anna Anatolievna Borunova a.borunova@ronc.ru

Background. The tumor microenvironment can both restrain tumor growth and promote disease progression. Therefore, the study of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) subpopulation composition is an urgent and significant topic.

Aim. To characterize the immune microenvironment of renal cancer by flow cytometry.

Materials and methods. The study included blood, kidney tumor and normal tissue of the removed kidney of 32 patients with clear cell renal cancer treated at N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. Kidney tissue was obtained during surgical removal of the tumor (resection/nephrectomy). A fragment of tumor and normal tissue was taken for analysis under the control of a morphologist. Blood for the study was taken on the day of surgery. Immunologic study was performed by flow cytometry. Kidney tissue was preliminarily homogenized and cell suspension was stained, as well as peripheral blood, with monoclonal antibodies to CD45, CD3, CD4, CD8, CD16⁺CD56⁺, CD19, CD28, CD279, CD11b labeled with different fluorochromes.

Results. T-lymphocytes and natural killer (NK) cells have a pronounced inverse correlation, which allowed us to distinguish two ($n = 32$; 18/14) variants of tumor immune microenvironment. T-cell variant, with predominance of CD3⁺CD8⁺ cells over CD3⁺CD4⁺ lymphocytes, and NK cell variant – increase in the number of NK cells with a pronounced decrease in the proportion of T-lymphocytes at the expense of CD3⁺CD8⁺ lymphocytes. The two variants are based on the difference of effector link – predominance of cells of innate (NK) or adoptive (CD3⁺CD8⁺) immunity. TILs immune profiles also differed in the number of CD8⁺PD1⁺ cells – in the T-cell variant their number was 2 times higher than in the NK cell variant. The similar distribution concerned CD4⁺ Treg cells.

Conclusion. Two immunologically competitive variants of renal tumor microenvironment were revealed – T-cell variant, characterized by a greater degree of infiltration and concentration of T-regulatory cells; NK cell variant, with an insignificant degree of infiltration and a pronounced strengthening of the effector link in the tissue and proinflammatory activity of peripheral blood.

Keywords: TILs, NK cells, CD8⁺PD1⁺ cells, cancer renal, SII index

For citation: Borunova A.A., Alimov A.A., Showa I.B. et al. The two types of immune microenvironment of renal cancer. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(2):60–8. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-60-68>

Введение

Рак почки считается иммуногенным новообразованием с большим количеством опухолеинфильтрирующих лимфоцитов [1]. Изучение микроокружения опухоли представляет особый интерес, потому что оно может создавать условия как для прогрессирования болезни, так и для ее сдерживания [2]. В литературе преимущественно описывают популяцию Т-клеток, когда говорят о лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль. При этом, в отличие от периферической крови, в ткани среди Т-лимфоцитов доминирует субпопуляция CD8⁺ Т-клеток. В отношении рака почки существуют противоречивые данные, так, по мнению одних авторов, увеличение этой субпопуляции клеток было связано с меньшим сроком выживаемости [3], а по результатам других исследователей, наоборот – с улучшением выживаемости [4]. Наличие клеток – естественных киллеров (NK) в опухолевом микроокружении связывают с благоприятным прогнозом при раке почки, желудка, пищевода, легких, яичников и колоректальном раке [5–7]. Увеличение Т-регуляторных лимфоцитов в опухолевом инфильтрате коррелирует с плохим прогнозом [8]. Микроокружение опухоли активно исследуют с помощью иммуногистохимического анализа, масс-спектрометрии и проточной цитометрии. Попытки выделить типы иммунного инфильтрата рака почки ведутся во всем мире, но описанные варианты пока остаются единичными исследованиями, малоприменимыми в практике [7, 9].

Цель исследования – охарактеризовать иммунное микроокружение рака почки методом проточной цитометрии.

Материалы и методы

В исследование включены образцы биоматериалов (кровь, опухоль почки и нормальная ткань удаленной почки) 32 пациентов (20 мужчин и 12 женщин) со светлоклеточным почечным раком (4 пациента с I стадией, 5 – со II стадией, 15 – с III стадией и 8 – с IV стадией), получавших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России. Средний возраст 61 год (41–77 лет).

Ткань почки (ТП) получена при хирургическом удалении опухоли (резекции/нефрэктомии). Для анализа брали фрагмент опухоли и нормальной ткани под контролем морфолога. Кровь для исследования забирали в день операции.

Иммунологическое исследование клеток крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухолевую и нормальную ТП, проводили методом проточной цитометрии. ТП предварительно гомогенизировали и обрабатывали клеточную суспензию, как и периферическую кровь, моноклональными антителами к CD45, CD3, CD4, CD8, CD16⁺CD56⁺, CD19, CD28, CD279, CD11b, меченными различными флуорохромами. Работа с ТП оказалась технически сложной, так как в образцах всегда присутствовал разной степени выраженности некроз опухолевой ткани и контаминация периферической кровью.

На основании данных клинического анализа крови дополнительно высчитывали индексы воспаления:

- 1) нейтрофильно-лимфоцитарный индекс – $NLR = \text{нейтрофилы} / \text{лимфоциты}$;
- 2) тромбоцитарно-лимфоцитарный индекс – $PLR = \text{тромбоциты} / \text{лимфоциты}$;
- 3) индекс системного воспаления – $SII = \text{тромбоциты} \times \text{нейтрофилы} / \text{лимфоциты}$;
- 4) лейкоцитарный индекс интоксикации по Островскому – $ЛИИ = \text{нейтрофилы} / \text{базофилы} + \text{эозинофилы} + \text{лимфоциты} + \text{моноциты}$.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета статистических программ SPSS 17.0 (IBM SPSS Statistics). Использовали параметрические и непараметрические статистические критерии: среднее значение и 95 % доверительный интервал – $\bar{X}$ (95 % ДИ); медиану и 1-й и 3-й квартили – $Me (Q_1-Q_3)$, оценку распределения исследуемых показателей проводили по критерию нормальности Шапиро–Уилка. Различия между показателями в независимых группах оценивали с применением t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна–Уитни, а различия в зависимых группах – W-критерия Уилкоксона. Корреляционная зависимость определялась с использованием ранговой корреляции Спирмена.

Результаты

При анализе количества Т-(CD3⁺) и НК-клеток (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) в опухолевой ткани (опухоле-

инфильтрирующих лимфоцитов – tumor-infiltrating lymphocytes, TILs) обращает на себя внимание диапазон разброса показателей – 50,8–94,5 % и 4,1–45,1 % соответственно. В структуре лимфоцитов, инфильтрирующих нормальную ткань, этот диапазон составил 68,9–91,0 % и 3,3–38,1 % соответственно. Так как Т-лимфоциты и НК-клетки имеют выраженную обратную корреляционную связь ($r = -0,916$; $p = 0,000$ для TILs), на основании показателей лимфоцитов нормальной ткани были выделены 2 группы иммунного профиля TILs – Т- и НК-клеточный варианты микроокружения опухоли (табл. 1, рис. 1, 2).

Степень инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами колебалась от 0,2 до 5,0 %, при этом у больных с Т-клеточным иммунным профилем TIL отмечалась большая концентрация клеток в опухоли по сравнению с НК-клеточным иммунным профилем – 1,9 (0,8–3,9) и 0,7 (0,5–1,7); $p = 0,05$ соответственно.

Интересным оказался тот факт, что уменьшение количества Т-лимфоцитов, наблюдаемое в группе с преобладанием НК-клеток, происходило за счет субпопуляции CD3⁺CD8⁺-клеток (CTL), при неизменном количестве CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов (табл. 2). Парный корреляционный анализ подтвердил достоверную выраженную обратную зависимость между популяциями клеток НК и CTL в структуре лимфоцитов, инфильтрирующих опухолевую ткань ($r = -0,599$; $p = 0,000$).

Таблица 1. Характеристика разделения лимфоцитов, инфильтрирующих опухолевую ткань почки, на 2 варианта иммунного микроокружения

Table 1. Characteristics of the division of tumor-infiltrating lymphocytes renal tissue into two variants of the immune microenvironment

Показатель Indicator	Т-клеточный вариант T-cell variant (n = 18)	НК-клеточный вариант NK cell variant (n = 14)
CD3 ⁺ , %	>68,9	<68,9
$\bar{X}$ (S)	79,9 (6,4)	61,5 (5,3)
Me (Q ₁ –Q ₃)	79,9 (74,2–85,3)	62,6 (58,1–63,8)
Min–Max	71,1–94,5	50,8–69,2
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , %	<22,1	>22,1
$\bar{X}$ (S)	13,3 (5,0)	31,8 (6,1)
Me (Q ₁ –Q ₃)	13,9 (8,5–17,7)	30,5 (26,5–35,3)
Min–Max	4,1–20,0	25,6–45,1

Примечание. $\bar{X}$ – среднее арифметическое; Me (Q₁–Q₃) – медиана и 1-й и 3-й квартили; Min–Max – минимальное и максимальное значения.

Note. $\bar{X}$ – arithmetic mean; Me (Q₁–Q₃) – median and 1st and 3rd quartiles; Min–Max – minimum and maximum values.

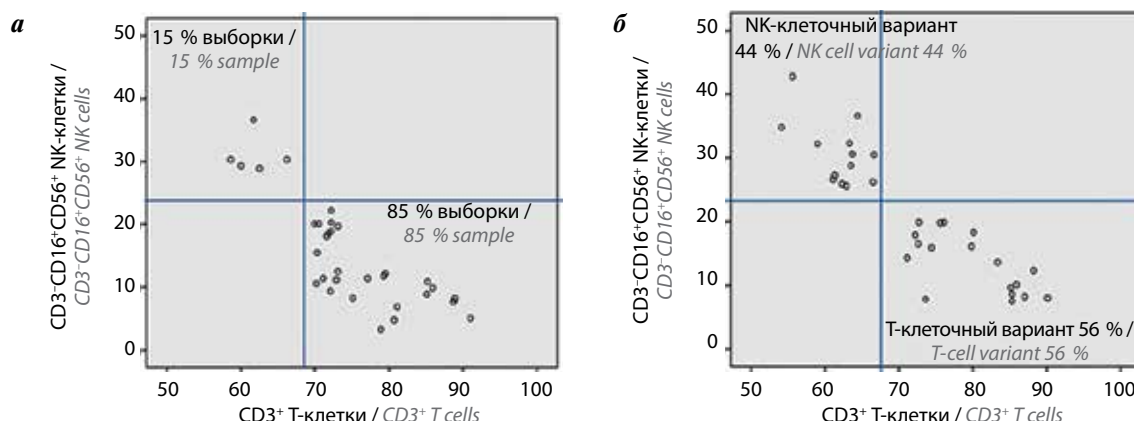


Рис. 1. Характеристика распределения пациентов по количеству Т- и NK-клеток в нормальной и опухолевой ткани почки: а — диаграмма распределения пациентов по количеству Т- (ось X) и NK-клеток (ось Y) в нормальной ткани; б — диаграмма распределения пациентов по количеству Т- (ось X) и NK-клеток (ось Y) в опухолевой ткани

Fig. 1. Characteristics of patients' distribution by the number of T- and NK cells in normal and tumor tissue of the kidney: а — diagram of patient distribution by the number of T- (X-axis) and NK cells (Y-axis) in normal tissue; б — diagram of patients' distribution by the number of T- (X-axis) and NK cells (Y-axis) in tumor tissue

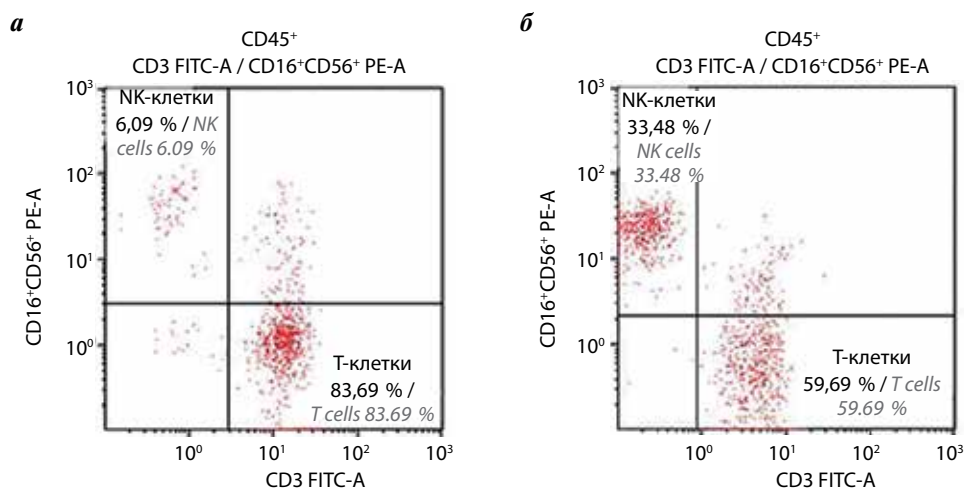


Рис. 2. Экспрессия CD3- и CD16⁺CD56-антигенов на поверхности CD45⁺-клеток, инфильтрирующих опухоль: а — пример Т-клеточного варианта TIL—DotPlot-цитограмма CD3 FITC против CD16⁺CD56 PE демонстрирует преобладание CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD45⁺-лимфоцитов; б — пример NK-клеточного варианта TIL—DotPlot-цитограмма CD3 FITC против CD16⁺CD56 PE демонстрирует значительное увеличение CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD45⁺-лимфоцитов

Fig. 2. Expression of CD3 and CD16⁺CD56 antigens on the surface of CD45⁺ tumor-infiltrating cells: а — example of T cell variant TIL—DotPlot cytogram of CD3 FITC vs CD16⁺CD56⁺ PE demonstrates predominance of CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD45⁺ lymphocytes; б — example of NK cell variant TIL—DotPlot cytogram of CD3 FITC vs CD16⁺CD56⁺ PE demonstrates a significant increase of CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD45⁺ lymphocytes

Отличалась также и структура CD8⁺-лимфоцитов — доля эффекторных клеток при NK-клеточном варианте микроокружения была в 1,8 раза выше, чем при Т-клеточном, а доля наивных клеток, наоборот, была ниже в 3 раза (рис. 3).

Различались TILs иммунных профилей и по количеству CD8PD1⁺-клеток — при преобладании Т-клеток их было в 2 раза больше, чем при NK-клеточном. Аналогичное распределение касалось и CD4⁺-Treg-клеток (см. табл. 2).

При попарном сравнении с нормальной тканью в группе с Т-клеточным иммунным профилем сте-

пень инфильтрации опухоли лимфоцитами была достоверно выше: 1,9 (0,8–3,9) % и 0,5 (0,1–1,3) %; $p = 0,008$, тогда как в группе с NK-клеточным профилем существенно не различалась: 0,7 (0,5–1,7) % и 0,8 (0,1–1,3) %. Характерным отличием нормальной ткани в субпопуляционной структуре инфильтрирующих лимфоцитов, единым для 2 групп, оказалось увеличение в опухолевой ткани количества:

- NK- и Т-клеток — 20,9 (6,2–31,9) % против 8,3 (6,0–14,7) %, $p = 0,044$ для группы с Т-клеточным и 18,6 (11,8–31,3) % против 9,8 (5,4–11,9) %, $p = 0,006$ для группы с NK-клеточным вариантом;

Таблица 2. Сравнительная характеристика субпопуляций Т- и NK-клеточного варианта иммунного микроокружения опухоли почки
Table 2. Comparative characteristics of T cell and NK cell subpopulations of the immune microenvironment of renal tumor

Показатель Indicator	Т-клеточный вариант T-cell variant (n = 18)	NK-клеточный вариант NK cell variant (n = 14)	p
	$\bar{X}$ (95 % доверительный интервал), % $\bar{X}$ (95 % confidence interval), %		
T cells (CD3 ⁺)	79,7 (76,7–83,1)	61,5 (58,4–64,7)	0,000
NK cells (CD3–CD16 ⁺ CD56 ⁺)	13,2 (10,8–15,8)	31,8 (28,3–35,3)	0,000
CD3 ⁺ CD4 ⁺	37,1 (31,9–42,1)	33,1 (26,3–39,9)	0,326
CTL (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	45,2 (37,9–52,6)	28,9 (23,5–34,4)	0,001
CD4 ⁺ Treg (CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127–)	5,1 (2,4–7,8)	1,8 (0,1–4,8)	0,037
CD8 ⁺ PD1 ⁺	27,9 (13,6–42,6)	13,0 (8,8–17,2)	0,050

Примечание. Здесь и в табл. 3: p – достоверность различий между параметрами, определяемая с применением t-критерия Стьюдента.

Note. Here and in Table 3: p – reliability of differences between the parameters, determined using Student's t-criterion.

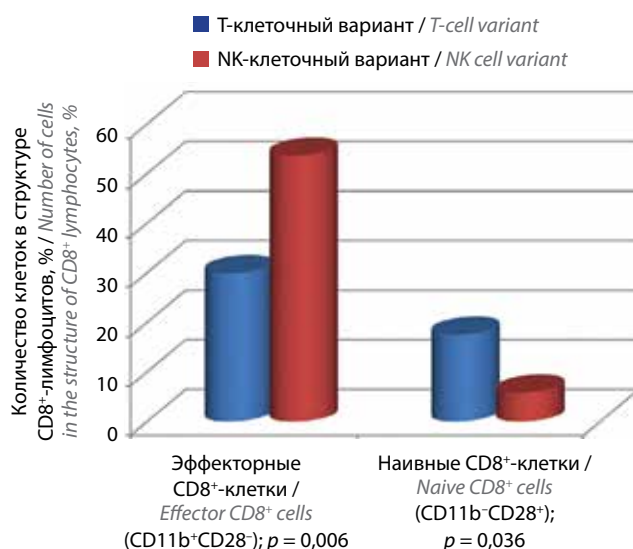


Рис. 3. Сравнение доли эффекторных и наивных клеток в структуре CD8⁺ TIL у больных с Т- и NK-клеточным вариантом иммунного микроокружения опухоли почки

Fig. 3. Comparison of the proportion of effector and naive cells in the CD8⁺ TIL structure in patients with T- and NK cell variant of tumor immune microenvironment of renal tumor

- CD4⁺PD1⁺-клеток – 19,4 (8,2–34,2) % против 12,7 (9,2–21,5) %; $p = 0,046$ для группы с Т-клеточным и 19,1 (14,6–23,5) % против 12,2 (8,6–14,7) %; $p = 0,005$ для группы с NK-клеточным вариантом.

Интересные результаты получены при сравнении показателей клинического анализа крови и их интегральных индексов у больных с различным иммунным профилем TILs (табл. 3). Для больных с преобладанием Т-клеток было характерно более высокое

количество лимфоцитов в периферической крови и более низкое – нейтрофилов по сравнению с показателями группы NK-клеточного профиля. Все воспалительные индексы у больных с преобладанием NK-клеток в структуре TILs были выше показателей больных группы Т-клеточного варианта.

Обсуждение

Степень инфильтрации лимфоцитами рака почки оказалась незначительной – до 5 %. Основным объектом нашего исследования была субпопуляционная структура лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль почки. Поскольку в отношении этих клеток не существует понятия нормы, были исследованы лимфоциты, инфильтрирующие условно нормальную ТП.

Ярким признаком в опухолевой ТП стало наличие большого количества NK-клеток в структуре TILs, максимальное значение – 45 %. В нормальной ТП их количество составляло до 20 %, что соответствует литературным данным [10]. Следует отметить, что хотя мы изучали неизмененную морфологически ткань удаленной почки, но иммунологически это была ткань пораженного органа, через которую осуществлялось перемещение лимфоцитов из кровеносного русла в опухолевый очаг, поэтому в 5 образцах нормальной ткани количество NK-клеток выпадало из общей группы.

В большинстве работ, посвященных опухолевому микроокружению, основное внимание уделяется Т-лимфоцитам [11, 12]. NK-клетки и их функциональная активность в опухолевом инфильтрате рассматриваются как самостоятельное звено [10, 13]. Мы показали, что Т-лимфоциты и NK-клетки имеют выраженную обратную корреляционную связь,

Таблица 3. Сравнительная характеристика показателей клинического анализа крови больных с Т- и НК-клеточным вариантом микроокружения опухоли почки

Table 3. Comparative characteristics of clinical blood analysis parameters of patients with T- and NK cell variant of the microenvironment of renal tumor

Показатель Indicator	T-клеточный вариант T-cell variant (n = 18)	NK-клеточный вариант NK cell variant (n = 14)	p
	$\bar{X}$ (95 % доверительный интервал), % $\bar{X}$ (95 % confidence interval), %		
Лейкоциты, абс. Leukocytes, abs.	8,1 (6,5–11,7)	8,2 (5,9–11,7)	0,898
Нейтрофилы, % Neutrophils, %	68,9 (61,5–75,9)	76,8 (62,7–87,5)	0,036
Нейтрофилы, абс. Neutrophils, abs.	4,1 (3,9–8,2)	5,8 (4,9–10,6)	0,046
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	18,1 (13,9–27,3)	13,4 (7,1–21,8)	0,013
Лимфоциты, абс. Lymphocytes, abs.	1,7 (1,5–1,9)	1,1 (0,9–1,5)	0,002
Тромбоциты, абс. Platelets, abs.	255,5 (211,0–337,7)	249,0 (197,7–326,5)	0,898
NLR	3,8 (2,3–5,2)	5,7 (2,8–12,7)	0,020
PLR	158,9 (132,6–205,7)	251,3 (136,4–308,5)	0,050
SII	887,1 (675,8–1713,1)	1285,9 (679,5–3188,4)	0,010
ЛИИ Островского LII Ostrovsky	2,2 (1,4–6,6)	3,3 (1,7–7,0)	0,029

Примечание. NLR – нейтрофильно-лимфоцитарный индекс; PLR – тромбоцитарно-лимфоцитарный индекс; SII – индекс системного воспаления; ЛИИ Островского – лейкоцитарный индекс интоксикации по Островскому.

Note. NLR – neutrophil-lymphocyte index; PLR – platelet-lymphocyte index; SII – systemic inflammation index; Ostrovsky's LII – leukocyte intoxication index according to Ostrovsky.

что позволило выделить два равновесных ($n = 32$; 18/14) варианта иммунного микроокружения опухоли: Т-клеточный вариант, наиболее часто встречающийся в описаниях, с преобладанием $CD3^+CD8^+$ -клеток над $CD3^+CD4^+$ -лимфоцитами, и НК-клеточный – характеризующийся увеличением количества НК-клеток при выраженном уменьшении доли Т-лимфоцитов. Как выявлено в нашем исследовании, это уменьшение Т-клеток обусловлено преимущественно за счет $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов и в меньшей, статистически не значимой, степени за счет $CD3^+CD4^+$ -субпопуляции. Таким образом, в основе двух видов иммунного инфильтрата лежит различие эффекторного звена – преобладание клеток врожденного (НК) или адаптивного ($CD3^+CD8^+$) иммунитета.

В сравнении с лимфоцитами, инфильтрирующим ТП вне опухоли, для Т-клеточного иммунного варианта микроокружения опухоли была характерна более высокая степень инфильтрации при схожей структу-

ре линейных популяций, а для НК-клеточного более значимым оказалось различие в соотношении Т-В-НК лимфоцитов при равной степени инфильтрации. Количество $CD4^+PD1^+$ -клеток в опухолевой ткани было существенно выше, чем в нормальной вне зависимости от варианта иммунного профиля микроокружения. Так как популяция $CD3^+CD8^+$ была в 1,6 раза больше при Т-клеточном варианте, количество $CD8^+PD1^+$ -клеток было в 2 раза больше, чем при НК-клеточном. В структуре $CD3^+CD8^+$ при НК-клеточном профиле преобладала доля эффекторных клеток при выраженном дефиците наивных лимфоцитов. Увеличение лимфоцитов, экспрессирующих PD1-антиген в опухолевой ткани связано с неблагоприятным прогнозом для пациентов с почечно-клеточным раком при таргетной терапии [14].

Еще одной особенностью при НК-клеточном варианте оказался провоспалительный фон в периферической крови, выражающийся в увеличении индексов воспаления. Прогностическая значимость

воспалительных индексов (NLR, PLR, SII), рассчитываемых на показателях общеклинического анализа крови — лимфоцитах, нейтрофилах и тромбоцитах, — активно изучается в онкологии. При раке почки увеличение SII индекса связано с ухудшением общей выживаемости и указывает на большую агрессивность злокачественного новообразования [15, 16]. Аналогичные данные показаны и в отношении NLR- и PLR-индекса [17, 18].

Похожее исследование провели финские ученые, которые анализировали, как и мы, периферическую кровь, опухоль и прилежащую опухоль нормальную ТП 52 больных раком почки, в том числе 39 пациентов со светлоклеточным почечным раком [19]. Исследование выявило гетерогенность TILs, что позволило разделить пациентов на 2 группы с высоким содержанием Т-лимфоцитов и NK-клеток, методом иерархической кластеризации D2. Мы в своей работе пошли другим путем — подтвердив обратную зависимость между Т- и NK-клетками, определили границу нормальных значений для NK-клеток в ТП, на основании чего и выделили два взаимоисключающих варианта иммунного микроокружения. Субпопуляционная характеристика 2 вариантов TILs, полученная нами, совпадает с данными финских исследователей. Фокусом их работы был анализ соматических мутаций как мишеней терапии. Наше исследование выявило связь типа опухолевого инфильтрата с показателями системного воспаления.

Таким образом, мы наблюдаем 2 вида локального иммунного ответа:

- Т-клеточный, характеризующийся большей степенью выраженности инфильтрации и концентрацией Т-регуляторных клеток в опухолевой ткани;
- NK-клеточный с незначительной степенью инфильтрации и выраженным усилением эффекторного звена в ткани и провоспалительной активностью периферической крови.

Субпопуляционная структура Т-клеточного типа иммунного профиля — преобладание CD3⁺CD8⁺, наличие CD4⁺PD1⁺ и CD8⁺PD1⁺-лимфоцитов, Т-регуляторных клеток свидетельствует о специфическом

клеточном взаимодействии иммунной системы и опухоли. Хотя данный вариант и обладает самыми высокими значениями инфильтрации TILs, его уровень не превышает 5 % порога, что, по сути своей, является слабой инфильтрацией.

При всей кажущейся привлекательности активации эффекторного звена при NK-клеточном варианте микроокружения, это — преобладание врожденного иммунитета, который не имеет способности запоминать. Низкая степень инфильтрации не предполагает каких-то выраженных ответов. Опухоль почки очень часто сопровождается очагами некроза, и данный тип инфильтрации может быть следствием неспецифического ответа без распознавания опухолевой ткани как чужеродной. Об этом же свидетельствует и низкий уровень Т-регуляторных клеток.

Определение варианта иммунного микроокружения опухоли даст клиницистам понимание типа иммунного ответа. При преобладании врожденного эффекторного звена инфильтрация опухоли Т-регуляторными клетками ничтожна, и применение специфической checkpoint-терапии не будет иметь мишени, а иммунные реакции не будут сопровождаться формированием иммунной памяти. Добавление терапии, основанной на цитокинах провоспалительного ряда (интерлейкина-2, интерферонов, факторе некроза опухоли), вызовет усиление данного типа инфильтрации [20].

Заключение

Выявлено 2 иммунологически конкурентных варианта микроокружения опухоли почки: Т-клеточный, характеризующийся большей степенью выраженности инфильтрации и концентрацией Т-регуляторных клеток в опухолевой ткани; NK-клеточный с незначительной степенью инфильтрации и выраженным усилением эффекторного звена в ткани и провоспалительной активностью периферической крови. С учетом равной частоты встречаемости этих 2 вариантов своевременная диагностика типа иммунного профиля микроокружения опухоли может оказаться значимой в выборе лечебной тактики.

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

1. Rooney M.S., Shukla S.A., Wu C.J. et al. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell* 2015;160(1-2):48–61. DOI: 10.1016/j.cell.2014.12.033
2. Giraldo N.A., Becht E., Pages F. et al. Orchestration and prognostic significance of immune checkpoints in the microenvironment of primary and metastatic renal cell cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21(13):3031–40. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2926
3. Rozsypalova A., Rosova B., Filipova A. et al. Negative prognostic significance of primary cilia, CD8⁺ tumor infiltrating lymphocytes and PD1⁺ cells expression in clear cell renal cancer. *J BUON* 2019;24(4):1644–51.
4. George D.J., Martini J.F., Staehler M. et al. Immune biomarkers predictive for disease-free survival with adjuvant Sunitinib in high-risk Locoregional renal cell carcinoma: From randomized phase III S-TRAC study. *Clin Cancer Res* 2018;24(7):1554–61. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2822
5. Riemann D., Cwikowski M., Turzer S. et al. Blood immune cell biomarkers in lung cancer. *Clin Exp Immunol* 2019;195(2): 179–89. DOI: 10.1111/cei.13219
6. Henriksen J.R., Donskov F., Waldström M. et al. Favorable prognostic impact of natural killer cells and T cells in high-grade serous ovarian carcinoma. *Acta Oncol* 2020;59(6):652–9. DOI: 10.1080/0284186X.2019.1711173
7. Geissler K., Fornara P., Lautenschläger C. et al. Immune signature of tumor infiltrating immune cells in renal cancer. *Oncoimmunology* 2015;4(1):e985082. DOI: 10.4161/2162402X.2014.985082
8. Liotta F., Gacci M., Frosali F. et al. Frequency of regulatory T cells in peripheral blood and in tumour-infiltrating lymphocytes correlates with poor prognosis in renal cell carcinoma. *BJU Int* 2011;107(9):1500–6. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2010.09555.x
9. Giraldo N.A., Becht E., Vano Y. et al. Tumor-infiltrating and peripheral blood T-cell immunophenotypes predict early relapse in localized clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2017;23(15):4416–28. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2848
10. Ma K., Zheng Z.R., Meng Y. Natural killer cells, as the rising point in tissues, are forgotten in the kidney. *Biomolecules* 2023;13(5):748. DOI: 10.3390/biom13050748
11. Kawashima A., Uemura M., Nonomura N. Importance of multiparametric evaluation of immune-related T-cell markers in renal-cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 2019;17(6):e1147–52. DOI: 10.1016/j.clgc.2019.07.021
12. Fan Z., Xu H., Ge Q. et al. Identification of an immune subtype-related prognostic signature of clear cell renal cell carcinoma based on single-cell sequencing analysis. *Front Oncol* 2023;13:1067987. DOI: 10.3389/fonc.2023.1067987
13. Schleyen J.S., Baur N., Kammerer R. et al. Cytotoxic markers and frequency predict functional capacity of natural killer cells infiltrating renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12(3 Pt 1):718–25. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0857
14. Ueda K., Suekane S., Kurose H. et al. Prognostic value of PD-1 and PD-L1 expression in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2018;36(11):499.e9–16. DOI: 10.1016/j.urolonc.2018.07.003
15. Yücel K.B., Yekedüz E., Karakaya S. et al. The relationship between systemic immune inflammation index and survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with tyrosine kinase inhibitors. *Sci Rep* 2022;12(1):16559. DOI: 10.1038/s41598-022-20056-3
16. Jin M., Yuan S., Yuan Y., Yi L. Prognostic and clinicopathological significance of the systemic immune-inflammation index in patients with renal cell carcinoma: A meta-analysis. *Front Oncol* 2021;11:735803. DOI: 10.3389/fonc.2021.735803
17. Cordeiro M.D., Ilario E.N., Abe D.K. et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts cancer outcome in locally advanced clear renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 2022;20(2):102–6. DOI: 10.1016/j.clgc.2021.10.009
18. Zhou X., Luo G. A meta-analysis of the platelet-lymphocyte ratio: A notable prognostic factor in renal cell carcinoma. *Int J Biol Markers* 2022;37(2):123–33. DOI: 10.1177/03936155221081536
19. Lee M.H., Järvinen P., Nisen H. et al. T and NK cell abundance defines two distinct subgroups of renal cell carcinoma. *Oncoimmunology* 2022;11(1):1993042. DOI: 10.1080/2162402X.2021.1993042
20. Yanagiya H., Kudoh S., Takahashi S., Suzuki T. Characterization of tumor infiltrating lymphocytes from patients with renal cell carcinoma – influence of combination therapy with interferon alpha and gamma. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1996;87(6):928–36. DOI: 10.5980/jpnjuro1989.87.928

Вклад авторов

А.А. Борунова: разработка плана исследования, получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи, анализ и интерпретация данных, написание статьи;
 А.А. Алимов: обзор публикаций по теме статьи, обсуждение и научное редактирование статьи;
 И.Б. Шоуа: получение данных для анализа, редактирование статьи;
 А.И. Чертова, З.Г. Кадагидзе, А.Ю. Кузеванова: обзор публикаций по теме статьи, редактирование статьи;
 Н.К. Жумабаев, Ф.М. Абдул, О.А. Халмурзаев, К.С. Немцева, А.В. Матвеев, П.В. Кононец, В.Б. Матвеев: предоставление материала для исследования, редактирование статьи;
 Т.Н. Заботина: разработка плана исследования, анализ и интерпретация данных, обсуждение и научное редактирование статьи.

Author's contribution

A.A. Borunova: development of the study design, obtaining data for analysis, review of publications on the topic of the article, analysis and interpretation of data, writing the article;
 A.A. Alimov: review of publications on the topic of the article, discussion and scientific editing of the article;
 I.B. Showa: acquisition of data for analysis, editing of the manuscript;
 A.I. Chertkova, Z.G. Kadagidze, A.Yu. Kuzevanova: review of publications on the topic of the article, editing of the manuscript;
 N.K. Zhumabaev, F.M. Abdul, O.A. Khalmurzaev, C.S. Nemtseva, A.V. Matveev, P.V. Kononets, V.B. Matveev: providing material for the study, editing of the article;
 T.N. Zabolina: development of the study design, data analysis and interpretation, discussion and scientific editing of the article.

ORCID авторов/ ORCID of authors

A.A. Борунова / A.A. Borunova: <https://orcid.org/0000-0002-1854-3455>
A.A. Алимов / A.A. Alimov: <https://orcid.org/0000-0002-8495-7728>
И.Б. Шоуа / I.B. Shoua: <https://orcid.org/0000-0002-9488-4710>
A.И. Черткова / A.I. Chertkova: <https://orcid.org/0000-0001-9146-5986>
З.Г. Кадагидзе / Z.G. Kadagidze: <https://orcid.org/0000-0002-0058-0987>
A.Ю. Кузеванова / A.Yu. Kuzevanova: <https://orcid.org/0000-0001-6156-9725>
Н.К. Жумабаев / N.K. Zhumabaev: <https://orcid.org/0000-0003-0649-3734>
Ф.М. Абдул / F.M. Abdul: <https://orcid.org/0009-0009-7642-8170>
О.А. Халмурзаев / O.A. Khalmurzaev: <https://orcid.org/0000-0001-7500-1815>
К.С. Немцева / K.S. Nemtseva: <https://orcid.org/0000-0002-1002-161X>
A.B. Матвеев / A.V. Matveev: <https://orcid.org/0009-0009-3280-1674>
П.В. Кононец / P.V. Kononets: <https://orcid.org/0000-0003-4744-6142>
B.B. Матвеев / V.B. Matveev: <https://orcid.org/0000-0001-7748-9527>
T.H. Заботина / T.N. Zabotina: <https://orcid.org/0000-0001-7631-5699>

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова» и темы НИР № И123021000086-7.

Funding. The work was performed within the framework of the state assignment of the Ministry of Education and Science of Russia for Research Centre for Medical Genetics and the theme of research work № И123021000086-7.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Compliance with patient rights and principles of bioethics. All the patients signed informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 31.08.2023. Принята в печать: 26.02.2024.
Article received: 31.08.2023. Accepted for publication: 26.02.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-69-77>

Исследование рисков возникновения лучевых реакций у пациентов, получающих облучение органов малого таза

О.В. Корытов¹, Л.И. Корытова¹, С.Г. Григорьев²

¹ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова» Минздрава России; Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 70;

²ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России; Россия, 194044 Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6

Контакты: Олег Витальевич Корытов olegkorytov@mail.ru

Введение. Онкологическая заболеваемость раком прямой кишки (РПК), раком предстательной железы (РПЖ) и раком шейки матки (РШМ) в последние 10–15 лет остается высокой. В России, как и во всем мире, поражение органов малого таза составляет до 25 % от общей заболеваемости. Лучевая терапия включается в комплекс лечебных мероприятий у 50–70 % онкологических больных. Основной особенностью лучевой терапии при злокачественных новообразованиях является воздействие как на опухолевые, так и на здоровые клетки окружающих тканей. Развитие лучевых повреждений здоровых тканей, выраженных в лучевых реакциях (ЛР) и поздних осложнениях, приводят к ухудшению качества жизни. К сожалению, прогнозировать у кого из пациентов разовьются лучевые повреждения выше I степени выраженности и на каких сроках в настоящее время не представляется возможным.

Цель исследования – оценить риски возникновения ЛР у пациентов с диагнозами РПК, РШМ и РПЖ, получавших лучевую терапию на область малого таза.

Материалы и методы. В исследование включены 759 пациентов, из них с РШМ – 387, с РПЖ – 175, с РПК – 197 человек, получавших лучевую терапию с 2011 по 2019 г. в лечебно-профилактических учреждениях Санкт-Петербурга и Ленинградской области.

Результаты. Исследовано более 30 факторов, которые характеризовали пациентов, особенности опухоли и варианты сопутствующей терапии. Значимыми из них оказались 12. С целью установления основных детерминант (факторов), связанных с риском развития ЛР, проведен дискриминантный анализ. Создана формула для расчета вероятности развития ЛР. Нами проведено дополнительное исследование по изменению сроков введения гидрогелевых композиций, при которых отмечено сокращение частоты радиационно-индуцированных циститов.

Заключение. Дискриминантный анализ выявил предикторы ЛР у пациентов с РПК, РШМ, РПЖ из 30 исследованных факторов. Из результатов дискриминантного анализа были выведены формулы предикции вероятности развития острых ЛР у пациентов с диагнозами РПК, РШМ и РПЖ, получавших лучевую терапию. Изменение времени назначения гидрогелевых композиций до лучевой терапии, в ее процессе и после окончания таковой способствовало снижению возникновения радиационно-индуцированных циститов по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$).

Ключевые слова: лучевая терапия, органы малого таза, лучевые реакции, дискриминантный анализ

Для цитирования: Корытов О.В., Корытова Л.И., Григорьев С.Г. Исследование рисков возникновения лучевых реакций у пациентов, получающих облучение органов малого таза. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(2):69–77.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-69-77>

Study of the risks of radiation induced reactions in patients receiving irradiation of the pelvic organs

Oleg V. Korytov¹, Luiza I. Korytova¹, Stepan G. Grigorjev²

¹A.M. Granov Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, Ministry of Health of Russia; 70 Leningradskaya St., Pesochny settlement, Saint Petersburg 197758, Russia;

²Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defense of Russia; 6 Academician Lebedev St., Saint Petersburg 194044, Russia

Contacts: Oleg Vitalievich Korytov olegkorytov@mail.ru

Background. The oncological incidence in the world and the Russian Federation of rectal cancer (RC), prostate cancer (PC) and cervical cancer (CC) over the past 10–15 years remains high, with overall incidence of the pelvic organs cancer up to 25 % of the total. Radiation therapy is included in the complex of therapeutic measures in 50–70 % of cancer patients. The main feature of radiation therapy of patients with malignant neoplasms is the effect on both tumor and healthy cells of surrounding tissues. The development of radiation damage to healthy tissues, expressed in radiation reactions (RR) and complications lead to a deterioration in the quality of life. Unfortunately, it is currently not possible to predict which of the patients will develop radiation injuries above grade 1 and at what time.

Aim. To assess the risks of RR in patients with diagnoses of RC, prostate cancer and cervical cancer who underwent radiation therapy.

Materials and methods. The study included 759 patients, including 387 CC, 175 PC, and 197 RC, who received radiation therapy from 2011 to 2019 in the medical institutions of St. Petersburg and the Leningrad region.

Results. More than 30 factors that characterized patients, tumor features and concomitant therapy options were studied. Twelve of them turned out to be significant. In order to establish the main determinants (factors) associated with the risk of radiation reactions, a discriminant analysis was carried out. A formula has been created to calculate the probability of developing RR. We conducted an additional study on changing the timing of the introduction of hydrogel compositions, in which a decrease in the frequency of radiation-induced cystitis was noted.

Conclusion. Discriminant analysis revealed predictors of RR in patients with RC, CC, and PC out of 30 factors studied. From the results of discriminant analysis, formulas for predicting the probability of developing acute RR in patients with diagnoses of RC, CC, and PC who received radiation therapy were derived. The change in the time of administration of hydrogel compositions before, during and after the end of radiation therapy contributed to a decrease in the occurrence of radiation-induced cystitis compared with the control ($p < 0.05$).

Keywords: radiation therapy, pelvic organs, radiation induced reactions, discriminant analysis

For citation: Korytov O.V., Korytova L.I., Grigorjev S.G. Study of the risks of radiation induced reactions in patients receiving irradiation of the pelvic organs. *Rossijskij bioterapevticeskij zurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(2):69–77. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-69-77>

Введение

Лучевая терапия (ЛТ) наряду с лекарственной терапией и хирургическими методами являются основой лечения онкологических больных. Онкологическая заболеваемость раком прямой кишки (РПК), раком предстательной железы (РПЖ) и раком шейки матки (РШМ) в последние 10–15 лет остается высокой. В России, как и во всем мире, поражение органов малого таза достигает 25 % от общего числа заболевших [1, 2]. По данным разных авторов, ЛТ включается в комплекс лечебных мероприятий у 50–70 % онкологических больных [3–6].

Основной особенностью ЛТ при злокачественных новообразованиях является воздействие как на опухолевые, так и на здоровые клетки окружающих тканей [3–5]. Постоянное стремление специалистов к повышению эффективности ЛТ привело к увеличению продолжительности жизни и к значительному росту числа пациентов, переживших лечение. Для этой категории больных через некоторое время на первый план выходит, наряду с продолжительностью жизни, ее качество [6–8].

Цель исследования — оценить риски возникновения лучевых реакций (ЛР) у пациентов с диагнозами РПК, РШМ и РПЖ, получавших ЛТ на область малого таза.

Материалы и методы

В исследование включены 759 пациентов (с РШМ — 387, с РПЖ — 175, с РПК — 197), получавших в рамках комплексного лечения ЛТ с 2011 по 2019 г. в 4 медицинских учреждениях Санкт-Петербурга и Ленинградской области. В исследование вошли 324 мужчины и 435 женщин в возрасте от 27 до 88 лет. Лечение пациентов выполнялось в соответствии с действующими на момент лечения клиническими рекомендациями Минздрава России.

Критериями включения пациентов исследование послужили:

1. Диагноз РПК, РШМ, РПЖ.
2. Запланированная изоэффективная суммарная очаговая доза (СОД) 46 Гр и более на линейном ускорителе электронов (ЛУЭ) с граничной энергией квантов до 18 МэВ и брахитерапевтических аппаратах (БТ) Bebig Multisource (Eckert & Ziegler BEBIG GmbH).
3. Подведенная изоэффективная СОД ≥ 40 Гр на ЛУЭ и БТ.

Критериями исключения пациентов из исследования послужили:

1. Диагностированный рак, кроме РПК, РШМ, РПЖ.
2. Запланированная изоэффективная СОД < 46 Гр на ЛУЭ и БТ.

3. Подведенная изоэффективная СОД <40 Гр на ЛУЭ и БТ.

Из 759 пациентов 575 получали ЛТ в рамках комплексного лечения с использованием 3D-технологий у 141 больного с диагнозом РПК, у 261 — с диагнозом РШМ и у 173 пациентов — с диагнозом РПЖ. У остальных пациентов было 2D-планирование ЛТ. Разовые дозы колебались от 2 до 5 Гр, лечение — 5 раз в неделю до достижения СОД: у пациентов с РПК — 50–54 Гр (25 Гр при разовой очаговой дозе 5 Гр) с радиомодификацией фторпиримидинами; с РШМ — дистанционная ЛТ 40–46 Гр + БТ 3×7 Гр с радиомодификацией производными платины; с РПЖ — 68–70 Гр, как правило, проводили на фоне гормональной терапии.

Динамическое фракционирование применялось у больных РПК в 24 случаях, РПЖ — в 84, а у больных РШМ в 210 случаях использовали сочетанную ЛТ.

Наличие ЛР устанавливали путем ретроспективного изучения имеющейся медицинской документации (историй болезни, амбулаторных карт). Часть пациентов заполняли представленные опросные листы во время лечения и последующих визитов.

Статистическая обработка полученного в исследовании материала проведена с помощью пакетного программного обеспечения Statistica 10.0.

Результаты

У 510 из 759 больных в процессе и после окончания ЛТ диагностированы ЛР со стороны органов малого таза: у больных РПК лучевой проктит зарегистрирован у 31,5 %, цистит — у 17,5 %, вагинит — у 0,1 %; у больных РШМ проктит отмечен у 18,4 %, цистит — у 14 %, вагинит — у 8,7 %; у больных РПЖ проктит фиксирован у 53,1 %, цистит — у 51 %; вне-тазовые ЛР: у больных РПК — дерматит в проекции полей облучения у 19,5 %; гематологическая токсичность (анемия, лейкопения, тромбоцитопения) — у 3,1 %; прочие (энтерит, колит, энтероколит, уретрит, нейропатия и т.д.) — у 10,9 %; у больных РШМ — дерматит в проекции полей облучения — у 50,8 %; гематологическая токсичность — у 32,4 %; прочие — у 4,3 %; у больных РПЖ: дерматит — у 16,6 %; гематологическая токсичность — у 2,3 %, прочие — у 4 %.

В большинстве изученных медицинских документов ЛР начинали регистрировать со II или III степени тяжести.

С целью купирования ЛР пациентам проводили сопутствующую терапию, направленную на купирование наиболее выраженных симптомов, которая состояла из препаратов, использовавшихся на основании жалоб больных с симптоматической целью: нестероидные противовоспалительные вещества, спазмолитики, гемостатические вещества, масляные смеси и т.д. Сопроводительную терапию из 759 па-

циентов получили 288, из них: с РПК — 82, с РШМ — 97, с РПЖ — 109 больных. Сопроводительная терапия состояла из 5 и более компонентов у 85 больных. Композиционные препараты на гидрогелевой основе, или гидрогелевые композиции (ГГК), в которых в качестве носителя основного лекарственного препарата использовался альгинат натрия, назначены в процессе ЛТ по мере выявления ЛР 61 больному (из общего числа 759 пациентов), из них с РПК — 35, с РШМ — 18, с РПЖ — 8 пациентам.

Перерывы в ЛТ по разным причинам зарегистрированы у 205 из 759 пациентов, из них с РПК — у 21, с РШМ — у 114, с РПЖ — у 70 больных. Среднее значение длительности перерыва в ЛТ составило 25,3 сут. Количество дней перерывов у больных достоверно различалось: при РПК среднее количество дней составило 17,7, при РШМ — 24,6, а при РПЖ — 28,6.

С целью установления основных детерминант, связанных с риском развития ЛР, проведен дискриминантный анализ. Весь массив первичных данных случайным образом разделен на 2 группы. Первая группа, включавшая 380 наблюдений, была предназначена для выявления значимых детерминант и последующего построения на их основе решающих правил, относящих конкретного пациента к одной из возможных групп:

- с более вероятным развитием ЛР;
- менее вероятным развитием ЛР.

Вторая группа, состоявшая из данных о 379 пациентах, являлась тестовой выборкой по оценке качества разработанных решающих правил.

Отбор значимых детерминант и построение модели проводилось с помощью дискриминантного анализа, и в частности его варианта пошагового отбора наиболее значимых признаков. Исследовано более 30 факторов, которые характеризовали пациентов, особенности опухоли и варианты сопутствующей терапии. Совокупно значимыми для формирования математической модели из них оказались 12. При этом порогом отбора избран уровень значимости более 90 % ($p < 0,1$), что вполне допустимо для многофакторных моделей. Указанные признаки, вошедшие в статистически значимую ($p < 0,001$) модель, приведены в табл. 1. Следует особо отметить, что исключение из расчета любого признака приводит к недостоверности прогноза всей модели.

Формулы для расчета имеют следующий вид:

$$\text{ЛДФ1 (вероятность осложнения низкая)} = -31,4 + 5,5 \times X_1 - 4,5 \times X_2 - 1,5 \times X_3 - 0,5 \times X_4 + 8,9 \times X_5 - 7,6 \times X_6 + 3,7 \times X_7 + 10,5 \times X_8 - 2,6 \times X_9 + 1,1 \times X_{10} + 3,4 \times X_{11} + 0,38 \times X_{12};$$

$$\text{ЛДФ2 (вероятность осложнения высокая)} = -32,7 + 9,7 \times X_1 - 2,6 \times X_2 - 4,0 \times X_3 - 0,7 \times X_4 + 7,8 \times X_5 - 6,5 \times X_6 + 4,2 \times X_7 + 9,7 \times X_8 - 4,7 \times X_9 - 0,35 \times X_{10} + 4,0 \times X_{11} + 0,4 \times X_{12}.$$

Для получения прогноза по модели вместо кодов признаков X подставляются значения признаков, выявленных у конкретного больного в цифровом значении, которое соответствует представленному

в табл. 1 (столбец 2 «Градация признаков»), и производят решение уравнений. Обследуемого больного следует отнести в ту группу, для которой ЛДФ больше по абсолютному значению, т. е. с учетом знака. Если

Таблица 1. Детерминанты, составившие классификационные функции, их коэффициенты и уровни значимости для применения в формулах расчета вероятности возникновения лучевых реакций

Table 1. The determinants that made up the classification functions, their coefficients and significance levels for use in formulas for calculating the probability of radiation reactions

Признак Sign	Градация признаков Gradation of signs	Код признаков Sign code	ЛДФ1 – низкая вероятность ЛР от лечения LDF1 – low probability of radiation reactions from treatment	ЛДФ2 – высокая вероятность ЛР от лечения LDF2 – high probability of radiation reactions from treatment	p
Применение 3D-планирования 3D planning	Да – 1 yes – 1, нет – 0 no – 0	X_1	5,5	9,7	<0,001
Использование сопутствующей терапии Use of concomitant therapy	Да – 1 yes – 1, нет – 0 no – 0	X_2	–4,5	–2,6	<0,001
Применение 5 и более компонентов для сопутствующей терапии The use of 5 or more components for concomitant therapy	Да – 1 yes – 1, нет – 0 no – 0	X_3	–1,5	–4,0	<0,001
Степень злокачественности опухоли Tumor grade	G1 – 1, G2 – 2, G3 – 3, недифференцированная not differentiated – 4, не указана not revealed – 9	X_4	–0,5	–0,7	<0,001
Гистологическое строение опухоли Histological tumor type	Плоскоклеточный рак – 1 squamous cell cancer – 1, аденокарцинома – 2 adenocarcinoma – 2, светлоклеточный рак – 3 light cell cancer – 3, недифференцированный рак – 4 nondifferentiated cancer – 4, перстневидноклеточный – 5 signet cell cancer – 5	X_5	8,9	7,8	0,001
Наличие незапланированных перерывов в лучевой терапии The presence of unplanned breaks in radiation therapy	Да – 1 yes – 1, нет – 0 no – 0	X_6	–7,6	–6,5	0,011
Диагноз с учетом пола Diagnosis and sex	РПК, женщины – 1 RC females – 1, РПК, мужчины – 2 RC males – 2, РШМ, женщины – 3 CC females – 3, РПЖ мужчины – 4 PC males – 4	X_7	3,7	4,2	0,015

Окончание табл. 1
End of table 1

Признак Sign	Градация признаков Gradation of signs	Код признаков Sign code	ЛДФ1 – низкая вероятность ЛР от лечения LDF1 – low probability of radiation reactions from treatment	ЛДФ2 – высокая вероятность ЛР от лечения LDF 2 – high probability of radiation reactions from treatment	p
Количество поступлений в клинику для лучевого лечения 1 случая заболевания (в случае наличия прерыва, потребовавшего выписки, указывается количество повторных госпитализаций) The number of admissions to the clinic for radiation treatment of 1 case of the disease (in case of a break that required discharge, the number of repeated hospitalizations is indicated)	Госпитализация для лучевого лечения не прерывалась – 1 Hospitalization for radiation treatment was not interrupted – 1, госпитализация прерывалась однократно, потребовалась повторная госпитализация для завершения курса лучевой терапии – 2 hospitalization was interrupted once, re-hospitalization was required to complete the course of radiation therapy – 2, госпитализация прерывалась дважды, потребовалась повторная госпитализация для завершения курса лучевой терапии – 3 hospitalization was interrupted twice, re-hospitalization was required to complete the course of radiation therapy – 3, госпитализация прерывалась трижды, потребовалась повторная госпитализация для завершения курса лучевой терапии – 4 hospitalization was interrupted three times, re-hospitalization was required to complete the course of radiation therapy – 4, госпитализация прерывалась четырежды, потребовалась повторная госпитализация для завершения курса лучевой терапии – 5 hospitalization was interrupted four times, re-hospitalization was required to complete the course of radiation therapy – 5	X_8	10,5	9,7	0,018
Наличие отдаленных метастазов Presence of distant metastases	Да – 1 yes – 1, нет – 0 no – 0	X_9	–2,6	–4,7	0,022
Применение гидрогелевых композиций при появлении реакций The use of hydrogel compositions when reactions occur	Да – 1 yes – 1, нет – 0 no – 0	X_{10}	1,1	–0,35	0,023
Наличие поражения регионарных лимфоколлекторов* Regional lymph nodes involvement*	0, 1, 2	X_{11}	3,4	4,0	0,06
Возраст в полных годах Calendar age, in full years	Количество лет Number of years	X_{12}	0,38	0,4	0,11
Свободный член Free member			–31,4	–32,7	

*В соответствии со значением параметра N по классификации TNM (tumor, nodus, metastasis).

Примечание. ЛДФ – линейная дискриминантная функция; ЛР – лучевые реакции.

*As by N parameter from TNM (tumor, nodus, metastasis) system.

Note. LDF – linear discriminant function; RR – radiation reactions.

большей оказалась ЛДФ1, у больного вероятность ЛР низкая; если большая ЛДФ2, вероятность ЛР высокая.

Общая классификационная способность модели составила 80,0 %. Оценка качества модели произведена с использованием экзаменующей выборки. При разработке модели на основе ее данных при пошаговом отборе в качестве предикторов оказались аналогичные признаки, а классификационная способность модели составила 81,5 % при достаточной статистической значимости ($p < 0,001$), что свидетельствует в пользу адекватности разработанной модели прогноза реальным данным исследования.

Параметр «применение ГГК» был выявлен как значимый при анализе более 30 возможных факторов влияния. Нами проведено дополнительное исследование, включавшее ГГК за 1 нед до начала ЛТ, в ее процессе и в течение 3–6 нед после окончания таковой. Проводили инстилляции ГГК в мочевого пузырь 66 пациентам (с РПК – 19, с РШМ – 22, с РПЖ – 25). Полученные результаты сравнили с частотой и степенью ЛР у 68 пациентов (с РПК – 20, с РШМ – 20, с РПЖ – 28) с идентичными основными признаками, получавших ЛТ и базовую сопроводительную терапию (биологические пары). Данные представлены в табл. 2.

Пациентам 1-й группы ($n = 66$) выполняли инстилляции ГГК + гиалуронат натрия по 10 мл до начала ЛТ, затем – 2–3 раза в неделю во время ЛТ. В случаях появления клинических и/или лабораторных проявлений радиационно-индуцированных циститов (РИЦ) ГГК с деринатом заменяли на ГГК с диоксином и лидокаином. После окончания ЛТ вводили ГГК с 1β-лейкином 2–3 раза в нед до 2–3 мес. Во 2-й группе сопроводительную терапию проводили по мере возникновения признаков цистита. Выраженность ЛР в основной группе в момент ЛТ не превышала I степени. У 7 пациентов 1-й группы отмечено более позднее начало цистита на СОД 20–34 Гр, максимальная степень выраженности не превышала I. Частота РИЦ в группе составила 9 % ($p < 0,05$). В контрольной группе ЛР возникали при подведении СОД от 14 до 27 Гр. РИЦ I степени диагностированы у 7 (10,3 %) пациентов, II степени – у 6 (8,8 %), III степени – у 4 (5,9 %). Общая частота РИЦ в группе контроля была 24,9 % ($p < 0,05$).

Обсуждение

В современной литературе представлено мнение разных авторов о подходах к прогнозированию острых ЛР и поздних повреждений здоровых органов и тканей, попадающих в зону облучения при проведении ЛТ у больных со злокачественными новообразованиями. Так, T.J. Yang и соавт. решили задачу установления предикторов острой гастроинтести-

нальной токсичности в процессе химиолучевой терапии у 177 пациентов с диагнозом РПК на основании анализа клинической информации, отражающей частоту еженедельной диареи и степень токсичности химиолучевой терапии. С учетом полученных данных проведен многофакторный регрессионный анализ, сочетавший дозиметрические и клинические переменные. Создана модель, которая включала в качестве предикторов пол, возраст, наличие жалоб на диарею, тенезмы, разные объемы прямой кишки (в см³), предварительно рассчитанные авторами, и средние дозы облучения. Авторы установили, что у пациентов женского пола наблюдалась значительно более высокая частота диареи степени 2⁺, чем у мужчин на 4-й неделе облучения – 24 % против 11 % соответственно ($p = 0,02$). Результат одномерного анализа показал значимую связь радиационно-индуцированного проктита степени 2⁺ с возрастом пациентов [9].

C. Mirjole и соавт. ретроспективно рассмотрели стандартные конечные точки, зависящие от дозы облучения и объема прямой кишки у 180 пациентов с РПЖ, получавших ЛТ по технологии IMRT (Intensity-Modulated Radiation Therapy, лучевая терапия с модуляцией интенсивности). Авторы предсказывают риск возникновения ЛР и поздних лучевых осложнений прямой кишки. Они использовали метод определения отдельного параметра, полученного из графика DVH (дозообъемного распределения), который позволяет прогнозировать острую желудочно-кишечную токсичность: $gAUC_{25-50}$ (площадь под кривой ректального DVH в диапазоне от 25 до 50 мГр), и рекомендуют, чтобы $gAUC_{25-50}$ всего объема прямой кишки не превышала 794 сГр [10].

M.C. Massi и соавт. для подтверждения прогностических моделей и биомаркеров токсичности ЛТ у 1681 больного РПЖ, включенного в международное проспективное когортное исследование, занимающееся проверкой прогностических моделей и биомаркеров токсичности ЛТ для снижения побочных эффектов и улучшения качества жизни у выживших после рака, осуществили альтернативный подход, сравнив 5 отдельных конечных точек поздней токсичности: поздние ректальные кровотечения, частоту мочеиспускания, гемат- и никтурию, снижение скорости потока мочи. Наряду с этим в анализ включены 42 гена с однонуклеотидным полиморфизмом (SNP), о которых известно, что они связаны с конечными точками радиационно-индуцированной токсичности. Данные в когорте пациентов изучены с помощью автоэнкодеров (нейронная сеть, которая копирует входные данные на выход), обученных распознавать признаки SNP (отличающие пациентов с токсичностью и без таковой). Авторы исходили из того, что радиационная токсичность представляет собой многофакторную проблему, связанную не только

Таблица 2. Характеристика групп больных, получавших гидрогелевые композиции в дополнение к базовой сопроводительной терапии (1-я группа, основная) и базовую сопроводительную терапию без гидрогелевых композиций (2-я группа, контрольная)

Table 2. Characteristics of groups of patients receiving hydrogel compositions as an addition to basic accompanying therapy (group 1, main) and basic accompanying therapy without hydrogel compositions (group 2, control)

Параметр Parameter	1-я группа, абс. и % Group 1, abs. and %					2-я группа, абс. и % Group 2, abs. and %				
	РПК RC	РШМ CC	РПЖ PC	Всего Total	%	РПК RC	РШМ CC	РПЖ PC	Всего Total	%
Мужчины Males	9	0	25	34	51,5	9	0	28	35	51,4
Женщины Females	10	22	0	32	48,5	11	22	0	33	48,6
18–44 лет 18–44 years	3	9	0	12	18,4	3	9	0	12	17,6
45–59 лет 45–59 years	4	10	10	24	36,6	4	6	17	27	39,7
60–74 лет 60–74 years	9	3	10	22	33,3	8	5	11	24	35,2
75–90 лет 75–90 years	2	1	5	8	12,1	0	1	4	5	7,5
T1*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2*	4	9	7	20	33,3	0	10	15	25	35,5
T3*	13	12	18	43	60,3	10	12	20	42	61,6
T4*	1	0	0	1	1,6	1	1	0	2	2,9
N0*	11	16	24	51	77,3	10	20	23	53	76,4
N1*	0	6	2	14	21,2	7	8	0	15	22,2
N2*	1	0	0	1	1,5	1	0	0	1	1,4

*Стадии рака по классификации TNM (tumor, nodule, metastasis).

Примечание. РПК – рак прямой кишки; РПЖ – рак предстательной железы; РШМ – рак шейки матки.

*TNM (tumor, nodule, metastasis) cancer stages.

Note. RC – rectal cancer; PC – prostate cancer; CC – cervical cancer.

с кумулятивной доставленной дозой излучения, но и с внутренними процессами в тканях, реагирующих на клеточное повреждение. Индивидуальный генетический фон и характер биологической экспрессии, а также клеточное микроокружение являются важными факторами в развитии постлучевых эффектов, хотя их точный вклад не известен [3].

В нашем исследовании были учтены основные характеристики пациентов и опухолей, а также особенности режимов лечения. Появление в результате дискриминантного анализа наряду с постоянными характеристиками (пол, возраст, верифицированный диагноз и др.) биополимерных материалов для нас оказалось неожиданной находкой. Поскольку наиболее частые радиационно-индуцированные осложнения включают геморрагический цистит, стриктуры уретры и мочеточников, свищи и вторичные злока-

чественные новообразования, исследование состояния мочевыделительной системы является весьма важным. Более того, нежелательные явления значительно ухудшают качество жизни больных, а в тяжелых случаях представляют собой угрозу для жизни [11]. Нарушения функции мочеполювой системы, связанные с лучевыми повреждениями, часто требуют сложных методов лечения и реконструкции [11–13]. В связи с этим мы изучили возможность снижения частоты лучевых циститов при модернизированных по времени, продолжительности и разнообразию примененных биополимерных материалов.

По данным разных авторов, ЛТ может быть включена в комплекс лечебных мероприятий у 50–70 % больных на разных этапах лечения. Современные технологии ЛТ, такие как 3D-конформная ЛТ, SBRT (stereotactic body radiotherapy, стереотаксическая

лучевая терапия), IMRT, VMAT (volumetric modulated arc therapy, объемно-модулированная дуговая терапия), протонная терапия и другие, являются более точными в подведении очаговых доз на опухоль, ограничивая отрицательное воздействие на окружающие здоровые ткани. Однако динамика опухолевого роста, расположение окружающих органов не позволяет полностью исключить воздействие радиации на здоровые ткани [3, 13, 14].

По нашим данным, исходя из выполненного многофакторного дискриминантного анализа следует, что для корректной оценки вероятности развития ЛР необходимо учитывать все факторы, выведенные в разработанной нами формуле. Исключение любого из них приводит к недостоверности всех остальных факторов.

Крайне важным оказалось применение сопутствующей терапии, причем как сам факт ее наличия, так и факт применения в ее составе 5 и более препаратов. При этом фактор использования ГГК имел независимое влияние на расчет вероятности развития ЛР. Использование таковых до ЛТ, во время ее проведения и после ее окончания независимо от факти-

ческого развития ЛР позволило сократить частоту РИЦ в 3 раза, равно как и степень его тяжести.

Выводы

- На основе 30 исследованных факторов с помощью дискриминантного анализа выявлено 12 из них в качестве детерминант вероятности развития ЛР. Рассчитанная дискриминантная модель обладает достаточными степенями классификационной способности (80 %) и статистической значимости ($p < 0,001$).
- Из результатов дискриминантного анализа выведены формулы прогнозирования вероятности развития острых ЛР у пациентов с диагнозами РПК, РШМ и РПЖ, получавших ЛТ в рамках комплексного лечения.
- Назначение биополимерных материалов до ЛТ, в ее процессе и после окончания таковой у пациентов с диагнозами РПК, РШМ и РПЖ способствовало снижению возникновения у них РИЦ по сравнению с больными, входившими в группу контроля ($p < 0,05$).

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

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. 239 с. The state of cancer care for the population of Russia in 2021. Ed. A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, A.O. Shahzadova. Moscow: P.A. Herzen Moscow State Medical Research Institute – branch of National Medical Research Center for Radiology of the Ministry of Health of Russia, 2022. 239 p. (In Russ.).
2. Siegel R.L., Miller K.D., Wagle N.S., Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin* 2023;73(1):17–48. DOI: 10.3322/caac.21763
3. Massi M.C., Gasperoni F., Ieva F. et al. A deep learning approach validates genetic risk factors for late toxicity after prostate cancer radiotherapy in a REQUITE multi-national cohort. *Front Oncol* 2020;10:541281. DOI: 10.3389/fonc.2020.541281
4. Brossard C., Lefranc A.C., Pouliet A.L. et al. molecular mechanisms and key processes in interstitial, hemorrhagic and radiation cystitis. *Biology (Basel)*. 2022;11(7):972. DOI: 10.3390/biology11070972
5. Lee S., Kerns S., Ostrer H. et al. Machine learning on a genome-wide association study to predict late genitourinary toxicity after prostate radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2018;101(1):128–35. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2018.01.054
6. Chorbińska J., Krajewski W., Zdrojowy R. Urological complications after radiation therapy-nothing ventured, nothing gained: A narrative review. *Transl Cancer Res* 2021;10(2):1096–118. DOI: 10.21037/tcr-20-2589
7. Widmark A., Gunnlaugsson A., Beckman L. et al. Ultra-hypofractionated versus conventionally fractionated radiotherapy for prostate cancer: 5-year outcomes of the HYPO-RT-PC randomised, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet* 2019;394(10196):385–95. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)31131-6
8. Choi E.P.H., Wan E.Y.F., Kwok J.Y.Y. et al. The mediating role of sleep quality in the association between nocturia and health-related quality of life. *Health Qual Life Outcomes* 2019;17(1):181. DOI: 10.1186/s12955-019-1251-5
9. Yang T.J., Oh J.H., Son C.H. et al. Predictors of acute gastrointestinal toxicity during pelvic chemoradiotherapy in patients with rectal cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2013; 6(5-6):129–36. PMID: 24312686
10. Mirjoleto C., Walker P.M., Gauthier M. et al. Absolute volume of the rectum and AUC from rectal DVH between 25Gy and 50Gy predict acute gastrointestinal toxicity with IG-IMRT in prostate cancer. *Radiat Oncol* 2016;11(1):145. DOI: 10.1186/s13014-016-0721-8
11. Ma J.L., Hennessey D.B., Newell B.P. et al. Radiotherapy-related complications presenting to a urology department: A more common problem than previously thought? *BJU Int* 2018;121(Suppl. 3):28–32. DOI: 10.1111/bju.14145
12. Toia B., Seth J., Ecclestone H. et al. Outcomes of reconstructive urinary tract surgery after pelvic radiotherapy. *Scand J Urol* 2019;53(2-3):156–60. DOI: 10.1080/21681805.2019.1611631
13. Mallick S., Madan R., Julka P.K., Rath G.K. Radiation induced cystitis and proctitis – Prediction, assessment and management. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16(14):5589–94. DOI: 10.7314/apjcp.2015.16.14.5589
14. Tree A.C., Ostler P., van der Voet H. et al.; PACE Trial Investigators. Intensity-modulated radiotherapy versus stereotactic body radiotherapy for prostate cancer (PACE-B): 2-year toxicity results from an open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol* 2022;23(10):1308–20. DOI: 10.1016/S1470-2045(22)00517-4

Вклад авторов

О.В. Корытов: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи, редактирование рукописи;

Л.И. Корытова: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, редактирование рукописи;

С.Г. Григорьев: статистическая обработка данных, анализ полученных данных, редактирование рукописи.

Author's contributions

O.V. Korytov: development of research design, data collection, data analysis, writing the text of the manuscript, editing of the manuscript;

L.I. Korytova: review of publications on the topic of the article, data analysis, editing of the manuscript;

S.G. Grigoriev: statistical data processing, data analysis, editing of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

О.В. Корытов / O.V. Korytov: <https://orcid.org/0000-0002-7472-9676>

Л.И. Корытова / L.I. Korytova: <https://orcid.org/0000-0003-0182-4856>

С.Г. Григорьев / S.G. Grigoriev: <https://orcid.org/0000-0003-1095-1216>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование получило одобрение этического комитета ФГБУ «РНЦРХТ им. акад. А.М. Гранова» Минздрава России № 01-04/2022 от 14.04.2022.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. All the patients signed informed consent to participate in the study. The study was approved by the Ethics Committee of the A.M. Granov Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies No 01-04/2022 dated 14.04.2022.

Статья поступила: 02.05.2023. Принята в печать: 21.02.2024.

Article received: 02.05.2023. Accepted for publication: 21.02.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-78-84>

Исследование препаратов Ридостин Про и Poly(I:C) в качестве адъювантов для противоопухолевой вакцины на модели E.G7-OVA

П.В. Царапаев¹, М.А. Барышникова¹, А.В. Пономарев¹, А.А. Рудакова¹, З.А. Соколова¹,
К.А. Барышников¹, Г.М. Левагина², Е.Д. Даниленко², В.С. Косоруков¹

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

²Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека»; Россия, 630010 Новосибирская область, Бердск, ул. Химзаводская, 9

Контакты: Мария Анатольевна Барышникова maba@ronc.ru

Введение. Адъювант необходим для усиления эффективности противоопухолевых пептидных вакцин. В наших предыдущих работах показана эффективность агонистов Toll-подобных рецепторов 3, к которым относятся Poly(I:C) и Ридостин Про, в составе пептидных неоантигенных вакцин против мышиной меланомы B16-F10.

Цель исследования – оценить противоопухолевую эффективность адъювантов Ридостин Про и Poly(I:C) в отношении лимфомы мышей E.G7-OVA.

Материалы и методы. Исследование проводили на мышах C57Bl/6 с подкожно перевитой лимфомой E.G7-OVA, содержащей полную последовательность куриного овальбумина. Оценивали противоопухолевый эффект применения препаратов Ридостин Про и Poly(I:C) в монотерапии, а также в вакцинах, содержащих помимо адъюванта куриный овальбумин. Противоопухолевый эффект препаратов Ридостин Про и Poly(I:C) оценивали при применении в разных режимах вакцинации: в одном случае лечение начинали после перевивки опухоли, а в другом случае – до перевивки опухоли. Критериями противоопухолевого ответа служили торможение роста опухоли, увеличение продолжительности жизни и излечение мышей.

Результаты. Ридостин Про и Poly(I:C) в составе вакцины, и при введении без овальбумина увеличивали процент торможения роста опухоли и продолжительность жизни мышей с лимфомой E.G7-OVA. В режиме, когда вакцинация овальбумином с препаратом Ридостин Про или Poly(I:C) начиналась до перевивки опухоли, показано полное излечение мышей.

Заключение. Ридостин Про и Poly(I:C) усиливают противоопухолевый эффект пептидной вакцины против лимфомы E.G7-OVA.

Ключевые слова: Ридостин Про, Poly(I:C), пептидная вакцина, овальбумин, E.G7-OVA

Для цитирования: Царапаев П.В., Барышникова М.А., Пономарев А.В. и др. Исследование препаратов Ридостин Про и Poly(I:C) в качестве адъювантов для противоопухолевой вакцины на модели E.G7-OVA. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(2):78–84.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-78-84>

Study of Ridostin Pro and Poly(I:C) as adjuvants for cancer vaccine on the E.G7-OVA model

Pavel V. Tsarapaev¹, Maria A. Baryshnikova¹, Aleksandr V. Ponomarev¹, Anna A. Rudakova¹, Zinaida A. Sokolova¹,
Kirill A. Baryshnikov¹, Galina M. Levagina², Elena D. Danilenko², Vyacheslav S. Kosorukov¹

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

²Institute of Medical Biotechnology of the State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vektor”; 9 Khimzavodskaya St., Berdsk, Novosibirsk region 630010, Russia

Contacts: Maria Anatolievna Baryshnikova maba@ronc.ru

Background. Adjuvant is necessary for enhancing the efficacy of cancer peptide vaccines. Our previous work has demonstrated the efficacy of TRL-3 agonists, which include Poly(I:C) and Ridostin Pro, as part of peptide neoantigen vaccines against murine melanoma B16-F10.

Aim. To evaluate the antitumor efficacy of Ridostin Pro or Poly(I:C) against murine lymphoma E.G7-OVA.

Materials and methods. The study was performed on C57Bl/6 mice with subcutaneously transplanted E.G7-OVA lymphoma containing the complete chicken ovalbumin sequence. The antitumor effects of Ridostin Pro and Poly(I:C) were evaluated in monotherapy as well as in vaccines containing chicken ovalbumin in addition to the adjuvant. The antitumor effect of Ridostin Pro and Poly(I:C) was evaluated when used in different vaccination regimens: in one case treatment was started after tumour transplantation and in the other case before tumour transplantation. The criteria of antitumor response were inhibition of tumour growth, increased survival of mice and cure.

Results. Ridostin Pro and Poly(I:C) both as part of the vaccine and when administered without ovalbumin increased the percentage of tumour growth inhibition and survival of mice with E.G7-OVA lymphoma. In a regime where vaccination with ovalbumin and Ridostin Pro or Poly(I:C) was started before tumour transfection, a complete cure of the mice was shown.

Conclusion. Ridostin Pro and Poly(I:C) enhance the antitumor effect of a peptide vaccine against E.G7-OVA lymphoma.

Keywords: Ridostin Pro, Poly(I:C), peptide vaccine, ovalbumin, E.G7-OVA

For citation: Tsarapaev P.V., Baryshnikova M.A., Ponomarev A.V. et al. Study of Ridostin Pro and Poly(I:C) as adjuvants for cancer vaccine on the E.G7-OVA model. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(2):78–84. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-78-84>

Введение

Для эффективной вакцинации необходимо при-
менение адъювантов, которые привлекают иммунные
клетки к месту инъекции, обеспечивают транспорт
антигенов к дренирующим лимфатическим узлам
и активируют антиген-презентирующие клетки [1].
Сами по себе антигены в составе вакцин обычно не-
достаточно эффективно стимулируют адаптивный
иммунный ответ. Если антигены, нацеленные
на незрелые антиген-презентирующие клетки, вво-
дятся без использования адъюванта и при отсутствии
воспаления или микробной активации, то они, ско-
рее, индуцируют толерантность, чем вызовут сильный
иммунный ответ [2].

Агонисты TLR все чаще применяются в качестве
адъювантов вакцин, поскольку они имитируют ми-
кробную стимуляцию и повышают эффективность
вакцинации, особенно при онкологических заболе-
ваниях [3, 4]. Синтетические аналоги двуцепочечной
РНК, распознаваемые Toll-подобным рецептором 3
(TLR-3), являются привлекательным кандидатом
в качестве адъювантов для вакцин, особенно против
внутриклеточных патогенов или опухолей, из-за их
способности усиливать Т-клеточные и антительные
иммунные ответы [5]. Один из наиболее изученных
агонистов TLR-3 — Poly(I:C), полиинозиновая: поли-
цитидиловая кислота, обладает противовирусным
и противоопухолевым потенциалом. Poly(I:C) акти-
вирует врожденный иммунитет, что впоследствии
приводит к регуляции адаптивного иммунитета, кор-
ректировке микроокружения опухоли и заметному
подавлению роста опухоли. Однако Poly(I:C) не при-
меняется в клинике из-за неоднородного размера

молекул, непоследовательной активности, низкой
стабильности и токсичности [6].

Ранее мы исследовали в качестве адъюванта
для пептидной противоопухолевой неоантигенной
вакцины препарат Ридостин Про, разработанный
в ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.
Ридостин Про — комплекс натриевых солей двуспи-
ральных и одноцепочечных рибонуклеиновых кислот
из киллерного штамма пекарских дрожжей *Saccharo-
myces cerevisiae*. Мы показали, что вакцинация мышей
неоантигенными пептидами с препаратом Ридостин
Про способствовала появлению специфического им-
мунного ответа к пептидам, входившим в состав вак-
цины. На модели мышинной меланомы B16-F10 так-
же показали, что Ридостин Про как самостоятельно,
так и в составе вакцины тормозил рост опухоли и уве-
личивал продолжительность жизни мышей с опу-
холью [7].

В данной работе мы продолжили исследование
препарата Ридостин Про в качестве адъюванта про-
тивоопухолевой вакцины, сравнивая его с Poly(I:C),
на другой модели опухоли — лимфоме мышей
E.G7-OVA, и при разных режимах вакцинации: в од-
ном случае лечение начинали после перевивки опу-
холи, а в другом случае — до перевивки опухоли.

Лимфома мышей E.G7-OVA получена в 1988 г.
из клеточной линии мышинной лимфомы EL4, транс-
фицированной плазмидой pAc-нео-OVA, содержа-
щей полную копию мРНК куриного овальбумина
и гена устойчивости к неомицину (G418). E.G7-OVA
экспрессирует овальбумин (OVA) и растет у мышей
C57BL/6, данная линия часто применяется для
изучения новых вакцинных адъювантов, так как

содержит известный антиген — овалбумин, и обычно противоопухолевый эффект оказывается достаточно выраженным [8].

Цель исследования — оценить противоопухолевую эффективность адъювантов Ридостин Про и Poly(I:C) в отношении лимфомы мышей E.G7-OVA.

Материалы и методы

Ридостин Про — рибонуклеинат натрия, индуктор интерферона пролонгированного действия, иммуномодулятор, предоставлен ИМБТ ГНЦ ВБ «Вектор». Состав препарата Ридостин Про: комплекс натриевых солей двуспиральных и одноцепочечных рибонуклеиновых кислот из киллерного штамма пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с содержанием нуклеотидного материала от 70 до 90 %, двуспиральной РНК — от 10 до 22 % (действующее начало), субстанция для изготовления лекарственных форм (ФСП Р№ 002021/01—070420090769—08); поливинилпирролидон (стабилизатор, обеспечивает пролонгацию биологических эффектов РНК). Лекарственная форма: лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного и подкожного введения.

Poly(I:C) (Polyinosinic–polycytidylic acid sodium salt, P1530-100MG, Sigma), синтетический аналог двуцепочечной РНК.

Препараты исследовали при одиночном применении и в составе вакцины, содержащей овалбумин (куриный яичный альбумин для использования *in vivo* — Ovalbumin EndoFit, InvivoGen).

Исследование проводили на мышах-самках линии C57BL/6 весом 20–22 г (экспериментально-биологическая лаборатория [виварий] ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России). Мышей содержали при комнатной температуре воздуха и естественном освещении. Животные имели постоянный доступ к питьевой воде и корму. Эксперименты проводили в соответствии с этическими требованиями к исследованиям на биологических моделях и экспериментальных животных, утвержденными в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

В исследовании использовали опухолевую модель лимфомы мыши E.G7-OVA, полученную из Биоресурсной коллекции ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Клетки наращивали *in vitro* в среде RPMI-1640, содержащей 2 мМ L-глутамин (НПП «ПанЭко», Россия), антибиотики пенициллин — стрептомицин (НПП «ПанЭко», Россия), 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (HyClone), при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂. Перед введением животным клетки отмывали, подсчитывали и разводили до требуемой концентрации в бессывороточной среде RPMI-1640. Клетки перевивали по 2 млн клеток

на мышь в 200 мкл бессывороточной среды RPMI-1640 подкожно.

На I этапе исследования изучали противоопухолевый эффект терапевтической вакцинации после перевивки опухолей. Мышей разделили на группы:

- группа 1 — контроль (без препаратов) ($n = 6$);
- группа 2 — Ридостин Про ($n = 6$);
- группа 3 — Poly(I:C) ($n = 6$);
- группа 4 — овалбумин и Ридостин Про ($n = 6$);
- группа 5 — овалбумин и Poly(I:C) ($n = 6$).

Мышам на 7-е и 14-е сутки после перевивки E.G7-OVA вводили овалбумин 100 мкг в 200 мкл физраствора или Ридостин Про 100 мкг в 300 мкл физраствора, или Poly(I:C) 50 мкг в 300 мкл физраствора, или смесь овалбумина с препаратом Ридостин Про (100 мкг и 100 мкг соответственно) в 500 мкл физраствора, или смесь овалбумина с Poly(I:C) (100 и 50 мкг соответственно) в 500 мкл физраствора подкожно рядом с опухолью. Измеряли рост лимфомы E.G7-OVA от дня перевивки опухоли (0-й день), чтобы оценить торможение роста опухоли.

На II этапе исследования изучали противоопухолевый эффект при начале вакцинации до перевивки опухоли. Мышей разделили на группы:

- группа 1 — контроль (без препаратов) ($n = 5$);
- группа 2 — Ридостин Про ($n = 5$);
- группа 3 — Poly(I:C) ($n = 4$);
- группа 4 — овалбумин и Ридостин Про ($n = 5$);
- группа 5 — овалбумин и Poly(I:C) ($n = 5$).

Мышей иммунизировали четырехкратно на 0; 7; 14 и 21-й дни эксперимента. На 11-й день от начала введения препаратов мышам перевивали подкожно лимфому E.G7-OVA по 2 млн клеток на мышь. Далее измеряли рост E.G7-OVA от дня перевивки опухоли (0-й день), чтобы оценить торможение роста опухоли (ТРО).

Показатель ТРО рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{ТРО (\%)} = (V_k - V_o) / V_k \times 100,$$

где V_k — средний объем опухолей в контрольной группе (мм³), V_o — средний объем опухолей в опытной группе (мм³).

Оценивали также изменение продолжительности жизни мышей в группах, получавших препараты, по сравнению с контролем. Увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) вычисляли после гибели всех животных в опыте по формуле

$$\text{УПЖ (\%)} = (\text{СПЖ}_o - \text{СПЖ}_k) / \text{СПЖ}_k \times 100,$$

где СПЖ_к — средняя продолжительность жизни животных в контрольной группе (дни), СПЖ_о — средняя продолжительность жизни животных в опытной группе (дни).

Для статистического анализа использовали критерий Манна–Уитни и применяли программу Statistica v. 7. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На I этапе исследовали влияние вакцинации овалбумином с адъювантами в терапевтическом режиме применения – вакцинацию проводили двукратно на 7-й и 14-й дни после перевивки опухоли E.G7-OVA. Результаты представлены в табл. 1. Овалбумин без адъювантов и Poly(I:C) не вызывали статистически значимого торможения роста опухоли. Введение препарата Ридостин Про без овалбумина и вакцинация обоими адъювантами совместно с овалбумином приводили к торможению роста уже имеющейся в начале лечения опухоли, статистически значимому по сравнению с контрольной группой. При совместном применении с овалбумином Ридостин Про ($p = 0,002$ на 30-е сутки по сравнению с контролем) был более эффективным, чем Poly(I:C) ($p = 0,02$ на 30-е сутки по сравнению с контролем).

На II этапе исследовали влияние вакцинации овалбумином с адъювантами в смешанном (профилактическом/терапевтическом) режиме применения, когда 2 вакцинации проводили до перевивки опухоли, а 2 – после таковой. Результаты представлены в табл. 2. При таком режиме вакцинации наблюдали торможение роста опухоли во всех группах по сравнению с контролем. В группах, вакцинированных овалбумином с Poly(I:C) и овалбумином с препа-

ратом Ридостин Про, опухоли не выросли ни у одной из мышей, наблюдали 100 % излечение.

На рис. 1 представлены результаты оценки выживаемости мышей при разных режимах вакцинации – терапевтическом, когда лечение начиналось после перевивки опухоли, и смешанном (профилактическом/терапевтическом), когда лечение начиналось до перевивки опухоли. При начале лечения после перевивки опухоли, несмотря на наблюдаемое торможение роста опухоли, мыши во всех группах погибли (см. рисунок, а). При режиме, когда вакцинация начиналась до перевивки опухоли, наблюдали полное излечение мышей в группах, вакцинированных овалбумином с препаратом Ридостин Про и овалбумином с Poly(I:C), а в группах, вакцинированных только адъювантами, детектировали увеличение продолжительности жизни и излечение части мышей (см. рисунок, б).

Таким образом, при сравнении 2 режимов вакцинации показано, что более эффективно тормозит рост опухоли E.G7-OVA и увеличивает продолжительность жизни, а также вызывает полное излечение мышей вакцинация в смешанном (профилактическом/терапевтическом) режиме, когда лечение начинается еще до перевивки опухоли. Иммунный ответ, развивающийся при таком режиме вакцинации, способен убить перевиваемые опухолевые клетки, тогда как вакцинация в терапевтическом режиме, которая начиналась через 1 нед после перевивки опухоли, приводила только к торможению роста лимфомы E.G7-OVA. Это еще раз подтверждает постулат о том,

Таблица 1. Противоопухолевая эффективность адъювантов и овалбумина при начале лечения после перевивки опухоли

Table 1. Antitumor efficacy of adjuvants and ovalbumin at the beginning of treatment after tumor inoculation

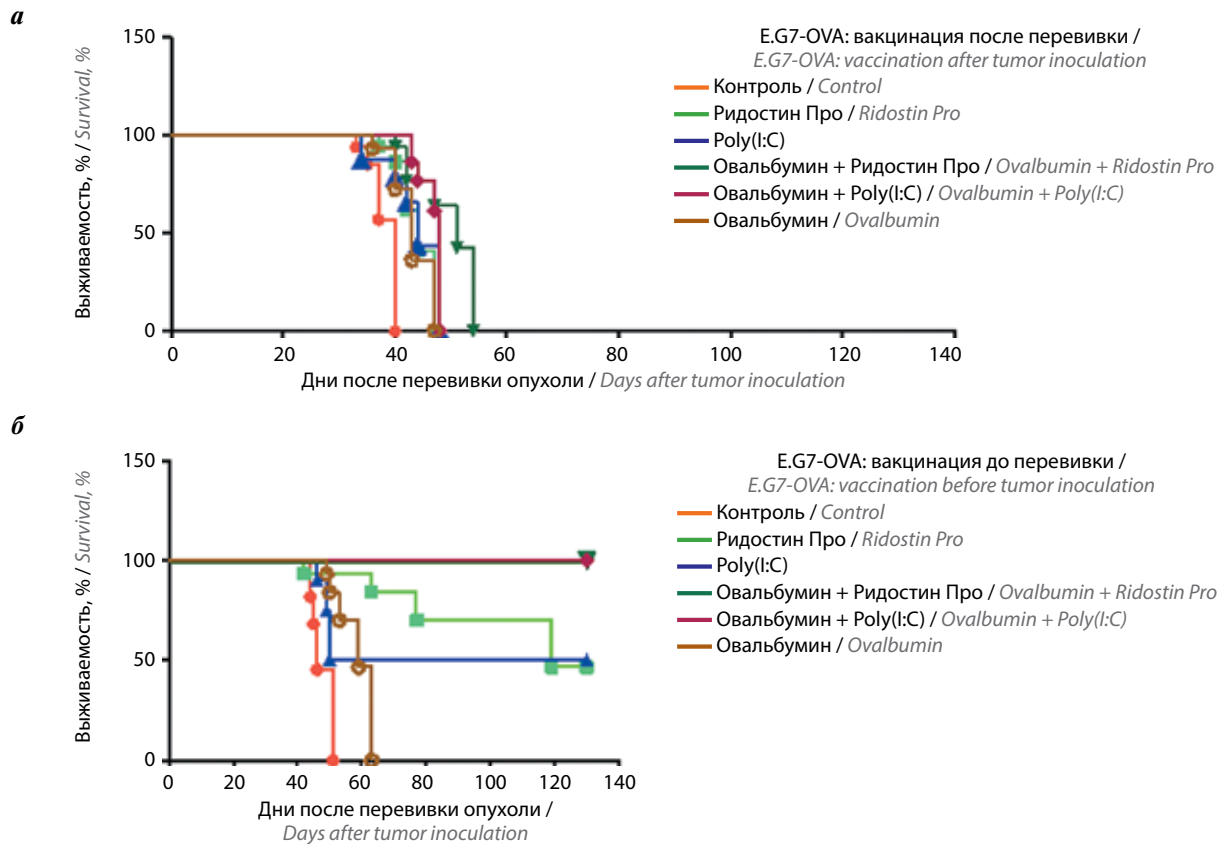
Группа Group	ТРО, % Inhibition of tumor growth, %									УПЖ, % Increase in life expectancy, %
	5-е сутки 5 th day	9-е сутки 9 th day	12-е сутки 12 th day	16-е сутки 16 th day	20-е сутки 20 th day	23-е сутки 23 rd day	26-е сутки 26 th day	28-е сутки 28 th day	30-е сутки 30 th day	
Овалбумин Ovalbumin	54	31	15	–1	13	10	4	–1	11	12
Ридостин Про Ridostin Pro	33	25	33	25	44*	45*	39*	36*	25	14
Poly(I:C)	39	39	36	8	19	21	8	10	16	9
Овалбумин + Ридостин Про Ovalbumin + Ridostin Pro	–6	21	22	70*	79*	76*	67*	65*	54*	24
Овалбумин + Poly(I:C) Ovalbumin + Poly(I:C)	–38	35	49*	54*	57*	57*	40*	46*	31*	23

Примечание. Здесь и в табл. 2: * $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем. ТРО – торможение роста опухоли, УПЖ – увеличение продолжительности жизни.

Note. Here and in Table 2: * $p \leq 0.05$ compared to control.

Таблица 2. Противоопухолевая эффективность адъювантов и овальбумина при начале лечения до перевивки опухоли
Table 2. Antitumor efficacy of adjuvants and ovalbumin at the beginning of treatment before tumor inoculation

Группа Group	ТРО, % Inhibition of tumor growth, %								УПЖ, % Increase in life expectan- cy, %	Изле- чение, % Recove- ry, %
	10-е сутки 10 th day	14-е сутки 14 th day	17-е сутки 17 th day	21-е сутки 21 st day	23-е сутки 23 rd day	25-е сутки 25 th day	29-е сутки 29 th day	32-е сутки 32 nd day		
Овальбумин Ovalbumin	58	48	64*	64*	62*	57*	57*	56*	41	Нет
Ридостин Про Ridostin Pro	100*	100*	99*	98*	94*	94*	90*	87*	64	20
Poly(I:C)	51	74	57	60	58	54	55	47	8	25
Овальбумин + Ридостин Про Ovalbumin + Ridostin Pro	100*	100*	100*	100*	100*	100*	100*	100*	—	100
Овальбумин + Poly(I:C) Ovalbumin + Poly(I:C)	100*	100*	100*	100*	100*	100*	100*	100*	—	100



Выживаемость мышей с лимфомой E.G7-OVA при начале вакцинации после перевивки (а) и до перевивки (б) опухоли
Survival of mice with lymphoma E.G7-OVA with vaccination after tumor inoculation (a) and before tumor inoculation (b)

что противоопухолевые вакцины наиболее эффективны при минимальной опухолевой нагрузке и их стоит применять для предотвращения рецидива после удаления опухоли.

Обнаружено, что при одиночном применении препарата Ридостин Про сильнее тормозил рост опухоли в обоих экспериментах по сравнению с Poly(I:C). При применении с овальбумином в эксперименте,

в котором лечение начиналось после перевивки опухоли, вакцина с препаратом Ридостин Про оказалась немного эффективнее, чем с Poly(I:C).

Это коррелирует с данными, полученными на модели меланомы B16-F10: включение препарата Ридостин Про в качестве адъюванта в состав нескольких моделей пептидной неоантигенной вакцины с разными пептидами показало, что он более эффективно усиливает иммуногенность пептидов, чем препарат сравнения Poly(I:C), а вакцина с адъювантом Ридостин Про замедляла рост меланомы B16-F10 и увеличивала среднюю продолжительность жизни мышей с опухолями [7].

Предполагается, что повышенная иммуностимулирующая активность препарата Ридостин Про связана с тем, что он, помимо двуцепочечной РНК, содержит и односпиральную РНК, что допускает во-

влечение в иммунный ответ не только TLR-3, но и TLR-7 и TLR-8 [9].

Заключение

На модели лимфомы мышей E.G7-OVA проведено сравнение препарата Ридостин Про с препаратом Poly(I:C) в качестве возможных адъювантов для противоопухолевых вакцин. Противоопухолевый эффект вакцин, содержащих в составе Ридостин Про, оказался немного сильнее по сравнению с вакцинами, содержащими Poly(I:C). Показано также, что начало вакцинации до перевивки опухоли более эффективно тормозит рост опухоли E.G7-OVA во всех группах, а применение в таком режиме препарата Ридостин Про с овальбумином или Poly(I:C) с овальбумином привело к полному излечению мышей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Барышникова М.А., Косоруков В.С. Адъюванты в вакцино-терапии опухолей. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(4):36–44. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-36-34 Baryshnikova M.A., Kosorukov V.S. Cancer vaccine adjuvants. Rossijskij bioterapevticeskij zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(4):36–44 (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-36-34
2. Paston S.J., Brentville V.A., Symonds P., Durrant L.G. Cancer vaccines, adjuvants, and delivery systems. Front Immunol 2021;12:627932. DOI: 10.3389/fimmu.2021.627932
3. Ammi R., De Waele J., Willemen Y. et al. Poly(I:C) as cancer vaccine adjuvant: Knocking on the door of medical breakthroughs. Pharmacol Ther 2015;146:120–31. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.09.010
4. Luchner M., Reinke S., Milicic A. TLR agonists as vaccine adjuvants targeting cancer and infectious diseases. Pharmaceutics 2021;13(2):142. DOI: 10.3390/pharmaceutics13020142
5. Ko K.H., Cha S.B., Lee S.-H. et al. A novel defined TLR3 agonist as an effective vaccine adjuvant. Front Immunol 2023;14:1075291. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1075291
6. Komal A., Noreen M., El-Kott A.F. TLR3 agonists: RGC100, ARNAX, and poly-IC: A comparative review. Immunol Res 2021;69(4):312–22. DOI: 10.1007/s12026-021-09203-6
7. Барышникова М.А., Пономарев А.В., Рудакова А.А. и др. Сравнение Ридостина Про и Poly(I:C) в качестве адъюванта для противоопухолевой неоантигенной пептидной вакцины. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(3):82–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-82-89 Baryshnikova M.A., Ponomarev A.V., Rudakova A.A. et al. Comparison of Ridostin Pro and Poly(I:C) as adjuvant for a cancer neoantigen peptide vaccine. Rossijskij bioterapevticeskij zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(3):82–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-82-89
8. Ponomarev A.V., Shubina I.Z., Sokolova Z.A. et al. Transplantable murine tumors in the studies of peptide antitumor vaccines. Oncol Rev 2024;17:12189. DOI: 10.3389/or.2023.12189
9. Vasilakos J.P., Tomai M.A. The use of Toll-like receptor 7/8 agonists as vaccine adjuvants. Expert Rev Vaccines 2013;12(7):809–19. DOI: 10.1586/14760584.2013.811208

Вклад авторов

П.В. Царапаев, М.А. Барышникова, А.В. Пономарев: разработка концепции и дизайна, сбор и обработка данных, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи, редактирование рукописи;

А.А. Рудакова, З.А. Соколова: предоставление материалов исследования, сбор и обработка данных, редактирование рукописи;

Г.М. Левагина, Е.Д. Даниленко: предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование рукописи;

К.А. Барышников, В.С. Косоруков: разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, редактирование рукописи.

Author's contributions

P.V. Tsarapaev, M.A. Baryshnikova, A.V. Ponomarev: development of concept and design, data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation, article preparation, editing of the article;

A.A. Rudakova, Z.A. Sokolova: provision of study materials, data collection and processing, editing of the article;

G.M. Levagina, E.D. Danilenko: provision of study materials, data analysis and interpretation, editing of the article;

K.A. Baryshnikov, V.S. Kosorukov: development of concept and design, data analysis and interpretation, editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

П.В. Царапаев / P.V. Tsarapaev: <https://orcid.org/0000-0002-1182-1010>

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

А.В. Пономарев / A.V. Ponomarev: <https://orcid.org/0000-0001-9517-8183>

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

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

К.А. Барышников / K.A. Baryshnikov: <https://orcid.org/0000-0002-9532-4264>

Г.М. Левагина / G.M. Levagina: <https://orcid.org/0000-0002-6749-5074>

Е.Д. Даниленко / E.D. Danilenko: <https://orcid.org/0000-0001-5026-1602>

В.С. Косоруков / V.S. Kosorukov: <https://orcid.org/0000-0002-8462-2178>

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

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

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

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках научно-исследовательской работы № 075-15-2021-1060 «Создание и развитие биоресурсной коллекции генетически и фенотипически охарактеризованных клеточных линий и первичных опухолей человека».

Funding. The work was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of research work No 075-15-2021-1060 "Creation and development of a bioresource collection of genetically and phenotypically characterized human cell lines and primary tumors".

Статья поступила: 25.03.2024. Принята в печать: 27.04.2024.

Article received: 25.03.2024. Accepted for publication: 27.04.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-85-92>

Разработка технологии и исследование комбинированных таблеток с модифицированным высвобождением преднизолона и лоратадина

В.В. Давыдова¹, Э.Ф. Степанова¹, А.М. Шевченко¹, А.С. Чиряпкин¹, А.П. Плетень², А.А. Прокопов²

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

²ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России; Россия, 127473 Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1

Контакты: Элеонора Федоровна Степанова efstepanova@yandex.ru

Введение. Аллергия является глобальной медико-социальной проблемой. Согласно международной статистике за последние десятилетия количество аллергических заболеваний резко увеличилось. В последние годы отмечен наибольший рост заболеваемости бронхиальной астмой, поллинозом и дерматозами. В настоящее время достигнут значительный успех в понимании причин и механизмов развития аллергического воспаления и формировании подходов к лечению аллергических заболеваний. Среди антигистаминных лекарственных средств II поколения выделяется лоратадин – эффективный противоаллергический препарат. Однако на фармацевтическом рынке ассортимент его лекарственных форм невелик – препарат выпускается в виде таблеток, капсул и сиропа. Преднизолон – лекарственное средство, которое быстро справляется с аллергической реакцией и помогает предотвратить возникновение нежелательных осложнений. В связи с этим предложено разработать таблетированную лекарственную форму комбинированного состава. При разработке модельных составов таблеток с напессованным покрытием использовали комбинированную технологию. Высвобождение и количественное содержание действующих веществ из модельных таблеток различного состава определяли с применением теста «Растворение» и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии соответственно.

Цель исследования – разработка таблеток комбинированного состава, включающих лоратадин и преднизолон. **Материалы и методы.** При разработке модельных составов таблеток с напессованным покрытием использовали комбинированную технологию. Высвобождение действующих веществ из таблеток подтверждали тестом «Растворение» в среде растворения 0,1 М хлористоводородной кислоте (HCl). Количественное содержание действующих веществ в лекарственной форме определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты. Проведенные исследования позволили определить состав комбинированных таблеток, обеспечивающий первоначальное высвобождение преднизолона и последующее – лоратадина. В тесте «Растворение» выбранный модельный состав таблеток № 1 обеспечивал высвобождение 84,4 % преднизолона и 81,5 % лоратадина соответственно на 10-й и 30-й мин.

Заключение. Продемонстрирована возможность получения таблетированной лекарственной формы, обеспечивающей последовательное высвобождение действующих веществ.

Ключевые слова: преднизолон, лоратадин, таблетки с модифицированным высвобождением

Для цитирования: Давыдова В.В., Степанова Э.Ф., Шевченко А.М. и др. Разработка технологии и исследование комбинированных таблеток с модифицированным высвобождением преднизолона и лоратадина. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(2):85–92.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-85-92>

Development of technology and study of combination tablets of prednisolone and loratadine with modified release

Victoria V. Davydova¹, Eleonora F. Stepanova¹, Alexander M. Shevchenko¹, Aleksey S. Chiriapkin¹, Anatoliy S. Pleten², Aleksey A. Prokopov²

¹Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute — a branch of the Volga State Medical University of Ministry of Health of Russia; 11 Kalinina Prospekt, Pyatigorsk 357532, Russia;

²Russian University of Medicine, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 20 Delegatskaya St., Moscow 127473, Russia

Contacts: Eleonora Fedorovna Stepanova efstepanova@yandex.ru

Background. Allergies are a global medical and social problem. According to international statistics, the number of allergic diseases has increased dramatically in recent decades. In recent years, the largest increase in the incidence of bronchial asthma, pollinosis and dermatoses has been noted. Currently, significant success has been achieved in understanding the causes and mechanisms of allergic inflammation and in forming approaches to the treatment of allergic diseases. Among second-generation antihistamines, loratadine, an effective antiallergic drug, is excreted. However, in the pharmaceutical market, the range of its dosage forms is small – the drug is available in the form of tablets, capsules and syrup. Prednisolone is a drug that quickly copes with an allergic reaction and helps prevent unwanted complications. In this regard, it is proposed to develop a tablet dosage form of a combined composition. Combined technology was used in the development of model compacted tablet formulations. The release and assay of active ingredients from model tablets of different compositions were determined using the Dissolution test and by high performance liquid chromatography, respectively.

Aim. Development of loratadine and prednisolone tablets of the combined structure.

Materials and methods. Combined technology was used in the development of model compacted tablet formulations. The release of the active ingredients from the tablets was confirmed by the Dissolution test in HCl dissolution medium (0.1 M). The assay of the active ingredients in the formulation was determined by high performance liquid chromatography.

Results. The conducted studies made it possible to determine the composition of the combined tablets, which ensures the initial release of prednisolone and the subsequent release of loratadine. In the Dissolution test, the chosen model composition of tablets No. 1 provided release of 84.4 % prednisolone and 81.5 % loratadine, respectively, at the 10th and 30th minutes.

Conclusion. The possibility of preparing a tablet dosage form providing a sequence of release of active substances has been demonstrated.

Keywords: prednisolone, loratadine, modified release tablets

For citation: Davydova V.V., Stepanova E.F., Shevchenko A.M. et al. Development of technology and study of combination tablets of prednisolone and loratadine with modified release. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(2):85–92. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-85-92>

Введение

Изменение экологии, загрязнение окружающей среды, появление новых синтезированных веществ, различных бытовых средств, изменение качества питания и многие другие факторы способствуют развитию аллергических заболеваний, количество которых в последнее время резко увеличилось [1–3]. В большинстве стран в лечении аллергии основное место занимают антигистаминные препараты II поколения (азеластин, акривастин, лоратадин, цетиризин и эбастин) [4–8]. Сегодня одним из самых безопасных и эффективных антигистаминных средств признан лоратадин [9, 10]. Относительно большой период полувыведения препарата из организма позволяет сократить количество его приемов до 1 раза в день. При лечении аллергических заболеваний также всегда была велика и многопланова роль глюкокортикоидов [11, 12]. В настоящее время на фармацевтическом рынке системные глюкокортикоиды представлены в виде различных лекарственных форм: инъекций, в том числе депо-форм, интраназальных средств и пероральных вариантов,

которые следует признать предпочтительными в связи с определенной рациональностью при варьировании курсом лечения и необходимостью коррективки доз. В связи с этим появляется возможность и целесообразность создания комбинированных лекарственных форм для лечения аллергических заболеваний. Предполагается, что разрабатываемая таблетированная лекарственная форма обеспечит первоначальное высвобождение преднизолона и последующее растворение лоратадина, механизм действия которых обуславливает подавление синтеза медиаторов воспаления, поступающих в синаптическую щель и предотвращение связывания их с H_1 -гистаминовыми рецепторами на постсинаптической мембране клеток. В настоящей статье рассмотрена возможность разработки таблетированной лекарственной формы с напессованной оболочкой, в состав покрытия которой введен преднизолон, а в ядро — лоратадин.

Цель исследования — разработка таблеток комбинированного состава, включающих лоратадин и преднизолон.

Материалы и методы

Лоратадин (этиловый эфир 4-(8-хлор-5,6-дигидро-11Н-бензо-[5,6]циклогепта[1,2-*b*]пиридин-11-илиден)-1-пиперидинкарбоновой кислоты) — противоаллергическое средство пролонгированного действия, блокатор H_1 — гистаминовых рецепторов [7].

Преднизолон (11β)-11,17,21-Тригидроксипрегна-1,4-диен-3,20-дион) — синтетический глюкокортикоидный препарат, дегидрированный аналог гидрокортизона, препарат группы системных кортикостероидов, обладает противовоспалительным, противоаллергическим и иммунодепрессивным действием [13].

При разработке модельных составов таблеток с напрессованным покрытием использовали комбинированную технологию. Для получения покрытия опытных образцов таблеток применили метод влажной грануляции, при разработке таблеток-ядер — технологию прямого прессования. Эффект пролонгирования обеспечивался за счет образования набухающей гидрофильной матрицы с помощью различных комбинаций производных целлюлозы.

При изготовлении опытных образцов таблеток для создания покрытия использовали: преднизолон (серия: K04F20191106, Henan Lihua Pharmaceutical Co. Ltd, Китай), лактозу (Ph. Eur, USP/NF, Таблетоза® 80, Molkerei MEGGLE, Германия), фосфат кальция двузамещенный (ГОСТ 3204, «Химмед», Россия), повидон Kollidon® 90 (Ph. Eur, USP/NF, BASF, Германия), Kollidon 64 VA (Ph. Eur, USP/NF, BASF, Германия), поливинилпирролидон (К-30) (Ph. Eur, USP/NF, ISP, США), натрия стеарилфумарат (Ph. Eur., USP/NF, Nitika Pharmaceutical PVT, Ltd, Индия).

При получении составов таблеток-ядер применили лоратадин (серия 10121, АО «Активный компонент», Россия), микрокристаллическую целлюлозу (102, 978-5-00218-376-0) (Eur, USP/NF, Blanver, Бразилия), гидроксиэтилцеллюлозу (Ph. Eur, USP/NF), гидроксипропилметилцеллюлозу (Ph. Eur, USP/NF, Benecel Ashland, Германия), магния стеарат (ГОСТ 32770), кроскармеллозу натрия (примеллозу, Ph. Eur, USP/NF, Cargil, Нидерланды), натрия гидрокарбонат (Ч или ХЧ, ГОСТ), лимонную кислоту (ГОСТ 31726—2012, Prime Chemicals Group), полипласдон XL-10 (Ph. Eur, USP/NF ISP, США).

Высвобождение действующих веществ (ДВ) из таблеток изучали с применением теста «Растворение» согласно ОФС 1.4.2.0014 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм», используя прибор «Вращающаяся корзинка» — определитель РС-1 (ООО «Партнер Про», Россия) при режиме перемешивания — 100 об/мин [14]. В качестве среды растворения использовали 0,1 М раствор хлористоводород-

ной кислоты (рН 1,2). Анализируемую таблетку, содержащую преднизолон (10 мг) и лоратадин (10 мг), помещали в корзинку, которую опускали в среду растворения объемом 900 мл (при температуре $37 \pm 0,5$ °С) и приводили во вращение. Каждые 10 мин отбирали пробу для анализа объемом 5 мл в течение 60 мин для количественного определения ДВ, перешедших в раствор, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). После каждого отбора пробы объем восполняли 5 мл свежей среды растворения, и продолжали проведение теста. Непосредственно перед проведением ВЭЖХ рН анализируемой пробы доводили до нейтральной среды (рН 6–7), добавляя несколько капель 1 М раствора натрия гидроксида, затем фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (Interlab, Россия).

ВЭЖХ-анализ осуществляли на жидкостном хроматографе «Хромос ЖХ-301» (ООО «Хромос Инжиниринг», Россия), оснащенном ультрафиолетовым детектором ECD2600 в изократическом режиме элюирования. В качестве подвижной фазы (ПФ) использовали смесь, состоящую из буферного раствора и ацетонитрила в объемном соотношении 60:40. Буферный раствор готовили путем растворения 6,8 г калия дигидрофосфата в 500 мл воды, доводили рН раствора до $2,80 \pm 0,05$ фосфорной кислотой и разбавляли водой до 1000 мл. Неподвижной фазой являлась колонка Luna C18 150 × 4,6 мм (Phenomenex, США) с размером частиц 5 мкм. Продолжительность анализа составляла около 20 мин, температура колонки 25 °С, объем вводимой пробы 20 мкл, длина волны детектирования 220 нм. Используемая методика основана на способе ВЭЖХ-анализа субстанции лоратадина (ФС. 2.1.0126.18 «Лоратадин»), в которой изменен элюент [14]. Это потребовалось для получения удовлетворительных хроматографических характеристик пиков лоратадина и преднизолона при их совместном анализе: эффективность более 5000 теоретических тарелок, коэффициент асимметрии для пиков соединений не превышает 1,5.

Для приготовления раствора стандартного образца (СО) лоратадина и преднизолона примерно 20 мг (точная навеска) лоратадина или преднизолона помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл. Прибавляли 70 мл метанола, перемешивали до полного растворения и доводили до метки метанолом. Затем 2,5 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили раствор до метки ПФ.

Расчет высвободившегося в среду растворения лоратадина и преднизолона из разработанных таблеток комбинированного состава (X, %) проводили, используя формулу

$$X = \frac{(S_x \times a_o \times 2,5 \times 900)}{(S_o \times 100 \times 50 \times P)} \times 100 \% = \frac{S_x \times a_o \times 0,45}{(S_o \times P)} \times 100 \%,$$

где S_x — площадь пика лоратадина или преднизолона на хроматограмме испытуемого раствора; S_o — площадь пика раствора, соответствующего СО; a_o — навеска СО лоратадина или преднизолона, мг; P — заявленное содержание лоратадина и преднизолона в таблетке, мг.

Результаты и обсуждение

При создании таблеток с напрессованной оболочкой необходимо было разработать технологию получения таблеток-ядер. Для повышения биодоступности, увеличения стабильности субстанций и создания их пролонгированных форм часто используют твердые дисперсии (ТД), которые входят в состав таблеток, капсул, пеллет и др. [15, 16]. Для обеспечения пролонгированного эффекта в ядро таблетки включили лоратадин в виде ТД состава: лоратадин + лактоза + глицерилмоностеарат Cutina (1:1:1), приготовленной по методике исследования [17]. При разработке таблеток-ядер использовали технологию прямого прессования. Такой наиболее значимый в таблетировании технологический прием способен обеспечить более быстрый результат и экономический приоритет данной технологической схемы. Эффект последующего высвобождения лоратадина предполагалось создать за счет образования набухающей гидрофильной матрицы с помощью различных комбинаций производных целлюлозы — гидроксиэтилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы, микрокристаллической целлюлозы. В состав матричного ядра включили также дезинтегранты (смесь натрия гидрокарбоната и лимонной кислоты, натрия кроскармеллозу, полипласдон XL-10) и смазывающий компонент (магния стеарат) (табл. 1).

Компоненты, входящие в составы ядер (см. табл. 1), взвешивали, помещали в ступку, перемешивали. Все ингредиенты просеивали сквозь сито с диаметром отверстий 0,5 мм. Таблетки-ядра (масса ≈ 120–140 мг) прессовали на таблеточной машине РТМ-12 на пресс-инструменте двояковогнутой формы диаметром 7 мм.

При разработке составов покрытия применили технологию влажной грануляции. Поскольку преднизолон малорастворим в воде, решили поместить его в 1-й слой оболочки без компонентов, замедляющих его высвобождение. Гранулят для покрытия получали следующим образом: все ингредиенты просеивали через сито с диаметром отверстий 0,5 мм, взвешивали (см. табл. 1), помещали в ступку и пере-

мешивали. Каждую композицию увлажняли 10 % водными растворами полимеров (10 % от массы от количества смеси), тщательно перемешивали до получения однородной массы. Полученную массу гранулировали сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, сушили в течение 10 мин при температуре 40–50 °С и снова протирали через сито (диаметр отверстий 1 мм). Полученные гранулы высушивали при температуре 50 °С до остаточной влажности не более 3,0 % и опудривали натрия стеарилфумаратом.

Таблетки с напрессованным покрытием получали с использованием двояковогнутого пресс-инструмента диаметром 10 мм. Таблетирование проводили также на ротационной таблеточной машине РТМ-12, для этого загружали 1/2 покрытия в матрицу на 10 мм, затем фиксировали таблетки-ядра по центру, загружали оставшуюся 1/2 часть покрытия и окончательно прессовали.

Как видно из табл. 1, опытные образцы таблеток представлены разным содержанием вспомогательных компонентов, которые оказывают влияние на скорость высвобождения ДВ из лекарственной формы.

Профили высвобождения ДВ из модельных таблеток различного состава, изученные с применением теста «Растворение» на приборе «Вращающаяся корзинка», представлены на рис. 1–5. В качестве примера приведена хроматограмма таблеток 1-го состава (рис. 6).

Всего изучено 5 модельных составов таблеток с разным содержанием вспомогательных веществ и соотношением компонентов. Установлено, что модельные составы № 3–5 не обеспечивали эффект последовательного высвобождения ДВ, что не отвечало задачам исследования. Начальное растворение преднизолона и последующее лоратадина наблюдали в модельных составах № 1 и 2, причем наибольшую разницу во времени высвобождения ДВ показал состав № 1 (табл. 2).

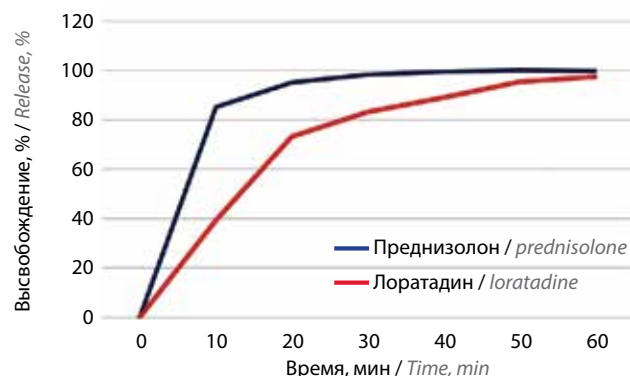


Рис. 1. Профили высвобождения преднизолона и лоратадина из таблетки (состав № 1)

Fig. 1. Prednisolone and Loratadine Release Profiles from Tablet (composition No. 1)

Таблица 1. Модельные составы комбинированных таблеток (диаметр 10 мм) с преднизолоном и лоратадином

Table 1. Model formulations of combination tablets (diameter 7 mm) with prednisolone and loratadine

Наименование сырья и материалов Description of raw materials and materials	Содержание, мг Content, mg				
	1	2	3	4	5
Оболочка: Shell:					
Преднизолон Prednisolone	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Лактоза Lactose	140,0	100,0	120,0	130,0	50,0
Кальция фосфат двузамещенный Calcium phosphate disubstituted	50,0	90,0	70,0	60,0	140,0
Kollidon® 90 (10 % водный) Kollidon® 90 (10 % aqueous)	2,0	—	—	—	2,0
Kollidon 64 VA BASF (10 % водный) Kollidon 64 VA BASF (10 % aqueous)	—	2,0	—	2,0	—
PVP K-30 Biohematica (10 % водный) PVP K-30 Biohematica (10 % aqueous)	—	—	2,0	—	—
Стеарил фумарат Na Sodium stearyl fumarate	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Масса таблетки Tablet weight	203,6	203,6	203,6	203,6	203,6
Ядро (диаметр 7 мм): Tablet core (diameter 7 mm):					
Лоратадин (твердая дисперсия) (лоратадин + лактоза + Cutina 1:1:1) Loratadine (solid dispersion) (loratadine + lactose + Cutina 1:1:1)	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
Микрокристаллическая целлюлоза-102 Microcrystalline cellulose-102	20,0	30,0	30,0	20,0	30,0
Гидроксиэтилцеллюлоза Hydroxyethyl cellulose	10,0	10,0	10,0	20,0	10,0
Гидроксипропилметилцеллюлоза Hydroxypropylmethylcellulose	20,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Кроскармеллоза натрия Croscarmellose sodium	25,0	—	—	—	35,0
Смесь гидрокарбоната натрия (NaHCO ₃) и лимонной кислоты Sodium (NaHCO ₃) hydrogencarbonate/citric acid mixture	—	13,0 10,0	—	20,0 15,0	—
Polyplasdone XL-10	—	—	25,0	—	—
Стеарат магния Magnesium stearate	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Масса ядра Tablet weight	105,7	103,7	105,7	115,7	115,7

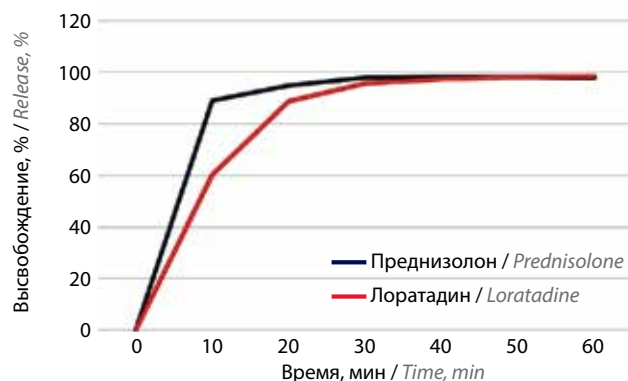


Рис. 2. Профили высвобождения преднизолона и лоратадина из таблетки (состав № 2)

Fig. 2. Prednisolone and loratadine release profiles from tablet (composition No. 2)

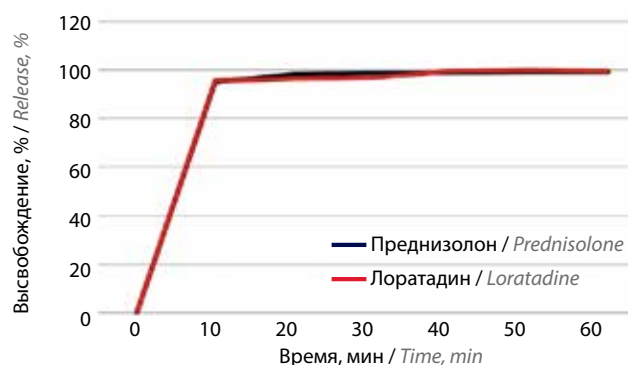


Рис. 3. Профили высвобождения преднизолона и лоратадина из таблетки (состав № 3)

Fig. 3. Prednisolone and loratadine release profiles from tablet (composition No. 3)



Рис. 4. Профили высвобождения преднизолона и лоратадина из таблетки (состав № 4)

Fig. 4. Prednisolone and loratadine release profiles from tablet (composition No. 4)

Указанный состав обеспечивал высвобождение преднизолона (84,4 %) и лоратадина (81,5 %) соот-

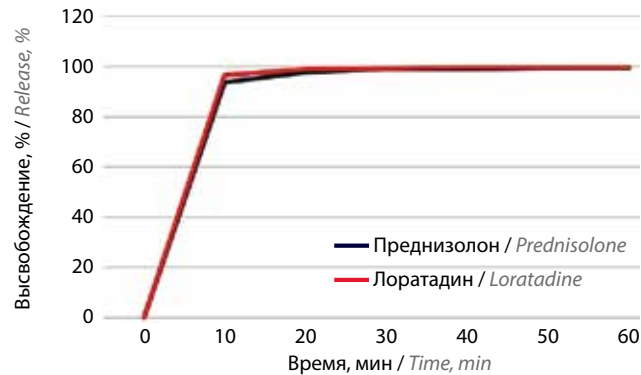


Рис. 5. Профили высвобождения преднизолона и лоратадина из таблетки (состав № 5)

Fig. 5. Prednisolone and loratadine release profiles from tablet (composition No. 5)

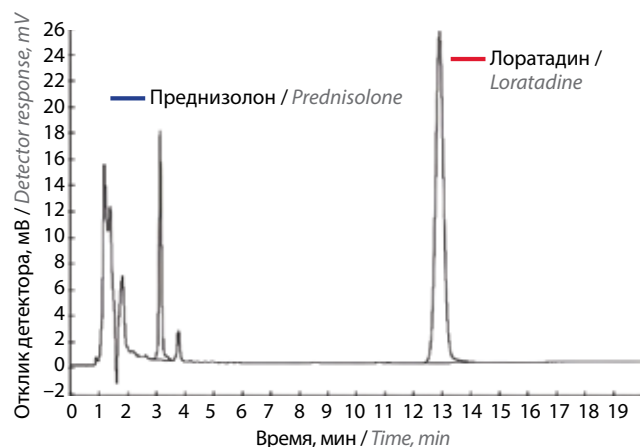


Рис. 6. Хроматограмма таблеток 1-го состава (время отбора пробы — 60 мин)

Fig. 6. Chromatogram of tablets of composition 1 after 60 minutes

ветственно на 10-й и 30-й минутах, что, по-видимому, обусловлено превалированием в оболочке водорастворимых компонентов, не препятствующих набуханию ядра. Различные виды оболочек существенно не влияли на процесс высвобождения преднизолона из лекарственной формы. Последующее растворение лоратадина осуществлялось за счет набухающей матрицы ядра.

Закключение

С учетом известных фармакологических свойств исследуемых компонентов с помощью оригинального технологического приема двухслойного таблетирования достигнута полнота и последовательность высвобождения ДВ из лекарственной формы, что предполагает достижение синергизма и комплексность действия, а также обеспечивает комфортность приема препаратов.

Таблица 2. Высвобождение действующих веществ из комбинированных таблеток модельного состава № 1

Table 2. Release rate of active ingredients from combination tablets of model composition No. 1

Время, мин Time, min	Доля высвободившегося действующего вещества, % ?						
	1	2	3	4	5	6	Среднее
Преднизолон Prednisolone							
10	85,8	83,0	85,2	82,5	87,2	82,7	84,4
20	95,6	94,5	94,0	92,8	96,4	93,9	94,5
30	97,2	97,3	98,7	97,9	98,2	96,5	97,6
40	98,8	98,4	99,5	98,6	98,7	97,3	98,6
50	100,6	99,0	99,2	98,8	99,1	98,6	99,2
60	100,0	98,7	99,3	98,0	98,9	98,4	98,9
Лоратадин Loratadin							
10	36,7	43,0	35,4	34,2	38,5	37,0	37,5
20	69,5	73,6	71,9	70,8	73,6	68,8	71,4
30	80,6	84,2	82,6	80,0	81,9	79,6	81,5
40	85,1	89,5	88,7	85,6	88,8	86,1	87,3
50	93,2	95,1	94,5	92,5	94,0	92,9	93,7
60	95,9	96,3	96,8	94,4	95,5	95,2	95,7

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ильина Н.И. Аллергия в России сегодня: проблемы и решения. Российский аллергологический журнал 2022;19(3):285–8. DOI: 10.36691/RJA1566

Ilyina N.I. Allergies in Russia today: Problems and solutions. Rossijskij allergologicheskij zhurnal = Russian Allergological Journal 2022;19(3):285–8. (In Russ.). DOI: 10.36691/RJA1566

2. Bayar M.N., Cingi C., Scadding G. Allergic rhinitis during pregnancy. Turk J Pharm Sci 2021;18(4):492–7. DOI: 10.4274/tjps.galenos.2020.33254

3. Keshav K.G., Shahram A. Medical management of rhinitis in pregnancy. Am J Transl 2022;14(10):7199–207. DOI: 10.1016/j.anl.2022.01.014

4. Ревякина В.А. Антигистаминные препараты в клинической практике. Дискуссионные вопросы. Взгляд врача на привычные препараты. Лечащий врач 2010;(7):71–3. Revyakina V.A. Antihistamines in clinical practice. Discussion issues. The doctor's view on the usual drugs. Lechashhij vrach = Attending physician 2010;(7):71–3. (In Russ.).

5. Оконенко Т.И., Костыркин М.А. Маркетинговый анализ ассортимента антигистаминных лекарственных средств на примере аптеки. Международный журнал экспериментального образования 2015;(11):208–11. Okonenko T.I., Kostyrkin M.A. Marketing analysis of the range of antihistamines on the example of a pharmacy. International Mezhdunarodnyj zhurnal jeksperimental'nogo obrazovaniya =

Journal of Experimental Education 2015;(11):208–11. (In Russ.).

6. Leonard B., Kenneth W.L., Steve B. Efficacy and tolerability of newer antihistamines in the treatment of allergic conjunctivitis. Med Lett Drugs Ther 2021;63(1622):57–64. DOI: 10.2165/00003495-200565020-00004

7. Громова О.А., Торшин И.Ю. Сочетанная терапия для лечения ОРВИ: анализ комбинированного комплекса Анви-Макс. Медицинский алфавит 2020;(21):33–48. DOI: 10.33667/2078-5631-2020-21-33-48

Gromova O.A., Torshin I.Yu. Combination therapy for the treatment of ARVI: analysis of the combined complex of AnviMax. Medicinskij alfavit = Medical Alphabet 2020;(21): 33–48 (In Russ.). DOI: 10.33667/2078-5631-2020-21-33-48

8. Клеменов А.В. Тактика лечения аллергических заболеваний во время беременности. Лечебное дело 2021;(1):625–30. Klemenov A.V. Tactics for the treatment of allergic diseases during pregnancy. Lechebnoe delo = Medical Case 2021;(1): 625–30. (In Russ.).

9. Weili D., Ni Zh., Xiaoyan Q., Jingpeng C. Effect of mometasone furoate combined with loratadine and montelukast sodium on inflammatory factors and pulmonary function in children with allergic rhinitis. Br J Hosp Med (Lond) 2022;83(2):1–9. DOI: 10.12968/hmed.2021.0570

10. AlMasoud N., Bakheit A.H., Alshammari M.F.M. et al. Loratadine. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol 2022;(47):55–90. DOI: 10.1016/bs.podrm.2021.10.002
11. Rodriguez-Martinez C.E., Sossa-Briceño M.P., Castro-Rodriguez J.A. Dexamethasone or prednisolone for asthma exacerbations in children: A cost-effectiveness analysis. Pediatr Pulmonol 2020;55(7):1617–23. DOI: 10.1002/ppul.24817
12. Kieffer T.E., Chin P.Y., Green E.S. et al. Prednisolone in early pregnancy inhibits regulatory T cell generation and alters fetal and placental development in mice. Mol Hum Reprod 2020;26(5):340–52. DOI: 10.1093/molehr/gaaa019
13. Скворцов В.В., Тумаренко А.В., Малякина Э.А. и др. Применение глюкокортикоидов в комплексной терапии COVID-19. Медицинский совет 2023;17(6):52–6. DOI: 10.21518/ms2022-049
Skvortsov V.V., Tumarenko A.V., Malyakina E.A. et al. The use of glucocorticoids in the complex therapy of COVID-19. Medicinskij sovet = Medical Council 2023;17(6):52–6. (In Russ.). DOI: 10.21518/ms2022-049
14. Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2023. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/>.
State Pharmacopoeia of the Russian Federation of the XV edition. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation, 2023. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/>.
15. Алексеев К.В., Кедик С.А., Блынская Е.В. и др. Фармацевтическая технология. Таблетки. М.: ИФТ, 2015; 672 с.
Alekseev K.V., Kedik S.A., Blynskaya E.V. et al. Pharmaceutical technology. Tabletes. Moscow: IFT, 2015; 672 p. (In Russ.).
16. Шикова Ю.В., Кадыров А.Р., Зайцева О.Е. и др. Использование в технологии получения лекарственных препаратов современных вспомогательных веществ — высокомолекулярных соединений. Здоровье и образование в XXI веке 2018;20(1):222–6. DOI: 10.26787/nydha-2226-7425-2018-20-1
Shikova Yu.V., Kadyrov A.R., Zaitseva O.E. et al. Use of modern excipients — high molecular weight compounds in the technology of preparing medicinal products. Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke = Health and Education in the 21st Century 2018;20(1): 222–6. (In Russ.). DOI: 10.26787/nydha-2226-7425-2018-20-1
17. Силаева С.Ю., Беленова А.С., Сливкин А.И. и др. Применение твердых дисперсных систем в фармации. Конденсированные среды и межфазные границы 2020;22(2):173–81. DOI: 10.17308/kcmf.2020.22/2820
Silaeva S.Yu., Belenova A.S., Slivkin A.I. et al. Use of solid dispersion systems in pharmacy. Kondensirovannye sredy i mezhfaznye granicy = Condensed media and interfacial boundaries 2020;22(2):173–81. (In Russ.) DOI: 10.17308/kcmf.2020.22/2820

Вклад авторов

В.В. Давыдова: написание текста рукописи, проведение технологической части работы, редактирование статьи;
Э.Ф. Степанова: разработка дизайна исследования, редактирование статьи;
А.М. Шевченко: помощь в проведении технологической части работы, редактирование статьи;
А.С. Чиряпкин: проведение химико-аналитической части работы, осуществление фармакопейного анализа и интерпретация результатов, редактирование статьи;
А.П. Плетень: редактирование статьи;
А.А. Прокопов: редактирование статьи.

Author's contributions

V.V. Davydova: writing the text of the manuscript, carrying out the technological part of the work, editing of the article;
E.F. Stepanova: development of the study design, editing of the article;
A.M. Shevchenko: assistance in carrying out the technological part of the work, editing of the article;
A.S. Chiriapkin: chemical and analytical part of the work, pharmacopoeial analysis and interpretation of the results, editing of the article;
A.P. Pleten: editing of the article;
A.A. Prokopov: editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.В. Давыдова / V.V. Davydova: <https://orcid.org/0000-0002-7992-2010>
Э.Ф. Степанова / E.F. Stepanova: <https://orcid.org/0000-0002-4082-3330>
А.М. Шевченко / A.M. Shevchenko: <https://orcid.org/0000-0001-8373-5907>
А.С. Чиряпкин / A.S. Chiriapkin: <https://orcid.org/0000-0001-8207-2953>
А.П. Плетень / A.A. Pleten: <https://orcid.org/0000-0003-4991-2150>
А.А. Прокопов / A.A. Prokopov: <https://orcid.org/0000-0003-0099-3690>

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 16.10.2023. **Принята в печать:** 26.02.2024.

Article received: 16.10.2023. **Accepted for publication:** 26.02.2024.

