

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



# Российский Биотерапевтический Журнал

Rossijskij bioterapevticeskij zurnal



Russian Journal  
of Biotherapy

4

ТОМ/VOL. 24  
2025

Российский Биотерапевтический Журнал  
2025 • ТОМ 24 • № 4

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

4 <sup>ТОМ 24</sup>  
'25

**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](mailto:biotherapy_rbj@mail.ru)  
[rbjournal@ronc.ru](mailto: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](mailto:abv@abvpress.ru)

[www.abvpress.ru](http://www.abvpress.ru)

Редактор Ю.Н. Бирюкова  
Корректор Т.Н. Помилуйко

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

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

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

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

Российский биотерапевтический журнал.  
2025. Том 24. № 4. 1–84.

© Оформление, верстка.

ООО «ИД «АБВ-пресс», 2025

Подписной индекс в каталоге агентства  
«Роспечать» – 81679.

Отпечатано в типографии «Фотобук Маркетинг».  
107023, Москва, ул. Электровзаводская, 14, стр. 1.  
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**, член-корреспондент РАН, 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, ведущий научный сотрудник ГБУЗ «Московский многопрофильный научно-клинический центр им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения города Москвы», профессор кафедры онкологии и рентгенодиагностики им. академика В.П. Харченко Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы», президент АНО «Национальный альянс специалистов по опухолям наружных локализаций» (Москва, Россия)

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

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

#### РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

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

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

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

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

**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)

При направлении статьи в редакцию журнала «Российский биотерапевтический журнал» авторам необходимо руководствоваться следующими правилами, составленными с учетом «Единых требований к рукописям, предоставляемым в биомедицинские журналы» (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals), разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов (International Committee of Medical Journal Editors).

**Редакция просит авторов в подготовке рукописей руководствоваться изложенными ниже правилами. Рукописи, оформленные без соблюдения данных правил, редакцией рассматриваться не будут.**

## 1. Общие правила

Статья в обязательном порядке должна сопровождаться официальным направлением учреждения, в котором выполнена данная работа, с подписью руководителя, заверенной печатью учреждения. При первичном направлении рукописи в редакцию в копии электронного письма должны быть указаны все авторы данной статьи. Обратную связь с редакцией будет поддерживать ответственный автор, обозначенный в статье (см. пункт 2).

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

Присланные статьи проходят проверку в системе «Антиплагиат» и принимаются в случае удовлетворительного результата (определяемого для каждой из статей в индивидуальном порядке по соотношению оригинальных фрагментов текста, заимствованных фрагментов и наличия оформленных ссылок).

## 2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

- 1) название статьи прописными буквами (шрифт **жирный**);
- 2) инициалы и фамилии всех авторов (шрифт **обычный**);
- 3) место работы каждого из авторов, адрес учреждения с указанием индекса (шрифт *курсив*);
- 4) ORCID авторов;
- 5) адрес электронной почты ответственного за связь автора (шрифт *курсив*).

Данные, указанные в пунктах 1–3, должны быть предоставлены на русском и английском языках.

**Пример:**

### ПУБЛИКАЦИЯ СТАТЬИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ»

**И.И. Иванов<sup>1</sup>, П.П. Петров<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское ш., 24;

<sup>2</sup>ФГБУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе», Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11

**Контакты:** Иван Иванович Иванов chem\_analysis@ronc.ru

### THE PUBLICATION OF THE ARTICLE IN «ROSSIYSKY BIOTHERAPEVTICHESKY ZHURNAL»

**I.I. Ivanov<sup>1</sup>, P.P. Petrov<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>N.N. Blokhin NMRCO; 24 Kashyrskoe Sh., Moscow, 115522, Russia;

<sup>2</sup>FSBSI "G.F. Gause Research Institute of search for new antibiotics"; 11 Bolshaya Pirogovskaya St, Moscow, 119435, Russia

Последняя страница должна содержать:

- 1) Сведения об авторе, ответственном за связь с редакцией:
  - фамилия, имя, отчество полностью; – занимаемая должность;
  - ученая степень, ученое звание; – контактный телефон;
  - рабочий адрес с указанием индекса; – адрес электронной почты.
- 2) Скан подписей всех авторов статьи.

## 3. Оформление текста

Статьи принимаются в формате doc, docx, rtf.

Шрифт – Times New Roman, размер 12, междустрочный интервал 1,5. Все страницы должны быть пронумерованы.

Текст статьи начинается со второй страницы.

## 4. Объем статей (включая список литературы, таблицы и подписи к рисункам)

**Обзор литературы** – не более 15 страниц,  
**оригинальная статья** – не более 12 страниц,  
**краткие сообщения** – не более 4 страниц.

Большой объем статьи допускается в индивидуальном порядке, по решению редакции.

## 5. Резюме и ключевые слова

Ко всем видам статей на второй странице должно быть приложено резюме на русском и английском языках. Слова «резюме» и “abstract” не указываются. Резюме должно кратко повторять структуру статьи, независимо от ее тематики. Для оригинальных статей резюме обязательно должно содержать следующие разделы:

- введение; – цель;
- материалы и методы; – результаты;
- заключение (выводы).

Объем резюме – 200–250 слов. Резюме не должно содержать ссылки на литературные источники и иллюстративный материал.

На этой же странице помещаются **ключевые слова** на русском и английском языке в количестве 3–10.

## 6. Структура статей

Оригинальная статья и краткое сообщение экспериментального или клинического характера должны содержать следующие разделы:

- введение; – цель;
- материалы и методы; – результаты и обсуждение;
- заключение (выводы); – конфликт интересов;
- при наличии финансирования исследования указать его источник (грант и т.д.);
- благодарности (раздел не является обязательным).

Обзоры литературы, статьи теоретического и концептуального характера должны включать следующие разделы:

- введение;
- разделы по отдельным обсуждаемым вопросам;
- заключение (выводы).

**Введение.** Краткий обзор состояния вопроса со ссылками на наиболее значимые публикации, при этом необходимости проведения исследования.

**Цель.** 1–3 предложения о том, какую проблему или гипотезу решает автор и с какой целью.

**Материалы и методы.** Подробное изложение методик исследования, аппаратуры, критериев отбора участников, их число и характеристики, способы и принципы распределения на группы, дизайн исследования, методы статистического анализа. Описанные методы исследования должны гарантировать возможность воспроизведения результатов. При перечислении использованной аппаратуры и препаратов в скобках указываются производитель и страна; при перечислении используемых в ходе работы лекарственных препаратов и химических веществ – их международное непатентованное (общепринятое) название, дозы, пути введения.

В конце статьи о проведенном исследовании указать, решением какого этического комитета оно одобрено, номер и дату протокола исследования, а также факт подписания испытуемыми информированного согласия.

**Результаты.** Должны быть представлены в логической последовательности, отражать данные описанного выше исследования с указаниями на графики, таблицы и рисунки. Допускается сопоставление полученных результатов с данными других исследователей. Возможно включение обоснованных рекомендаций для клинической практики и применения полученных данных в предстоящих исследованиях. Следует избегать повторения сведений из раздела «Введение». Результаты представляются четко, в виде коротких описаний.

**Заключение.** Должно быть кратким и лаконичным. Подведение итога проделанной работы и гипотеза автора о значении полученных данных – в рамках патогенеза, лечения, диагностики; перспективы использования полученных данных.

## 7. Иллюстративный материал

Иллюстративным материалом являются фотографии, рисунки, схемы, графики, диаграммы, таблицы. В тексте должны быть указаны ссылки на таблицы и рисунки, например: (табл. 1), (рис. 1) или **на рис. 1 представлены** . . . , которые должны быть размещены в соответствующих по смыслу абзацах и последовательно пронумерованы. Рисунки и таблицы нумеруются отдельно.

Иллюстративный материал должен быть представлен в виде отдельных файлов и не фигурировать в тексте статьи. Схемы, графики, диаграммы, таблицы могут быть собраны в общие файлы по типу иллюстративного материала с началом каждого с новой страницы. Например: все таблицы собраны в отдельный от статьи файл, где каждая новая таблица начинается с новой страницы. Если в этой же статье есть диаграммы, то они будут составлять следующий файл, где будут собраны исключительно диаграммы, и каждая из них будет размещена на отдельном листе документа. Файлы иллюстративного материала должны позволять воспроизвести высокое качество изображения в электронной и печатной версии журнала. Если иллюстративный материал ранее был опубликован в других изданиях, автор обязан предоставить в редакцию разрешение правообладателя на публикацию данного изображения в другом журнале, в противном случае это будет считаться плагиатом и к публикации принято не будет. Количество иллюстраций должно соответствовать объему предоставляемой информации, избыточность иллюстраций может привести к возвращению авторам статьи для доработки на предмет сокращения. Данные таблиц не должны повторять данные рисунков и текста и наоборот.

**Фотографии** представляются в формате TIFF, JPG с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм). Глаза пациентов или здоровых испытуемых на фотографиях должны быть закрыты черным прямоугольником, в случае его отсутствия автор должен предоставить в редакцию письменное разрешение пациента на публикацию.

**Рисунки, графики, схемы, диаграммы** представляются в формате EPS Adobe Illustrator 7.0–10.0 или Office Excel. При невозможности представления в данном формате необходимо связаться с редакцией.

Все **рисунки** должны быть пронумерованы и снабжены подписочными подписями. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита – «а», «б» и т.д. Все сокращения, обозначения в виде кривых, букв, цифр и т.д., использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подписочной подписи. Подписи к рисункам даются на отдельном листе после текста статьи в одном с ней файле.

### Названия рисунков должны быть переведены на английский язык.

Таблицы должны быть наглядными, иметь название и порядковый номер. Заголовки граф должны соответствовать их содержанию. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице. Необходимо указывать применявшийся для анализа статистический метод и соответствующее значение достоверности (р). В случае размера таблиц больше, чем на лист А4, они представляются в виде отдельного файла doc, docx, rtf.

### Названия таблиц должны быть переведены на английский язык.

Все **формулы** должны быть тщательно выверены автором, набраны или встроены в формат текстового редактора. В формулах необходимо различать строчные и прописные, латинские и греческие, подстрочные и надстрочные буквы. Исползованные автором сокращения должны быть разъяснены под формулой.

## 8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ). Если исследование проводилось на приборах, дающих показатели в других единицах, необходимо перевести их в систему СИ с указанием коэффициента пересчета или компьютерной программы в разделе «Материалы и методы».

Сокращения слов не допускаются, кроме общепринятых. Все аббревиатуры в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом упоминании (например, рак предстательной железы (РПЖ)). Список использованных сокращений приводится после списка литературы. Не следует параллельно использовать термин и его сокращение.

Название генов пишется курсивом, название белков – обычным шрифтом.

## 9. Список литературы

Не менее 50 процентов источников из списка литературы должны быть опубликованы за последние 5 лет, в том числе в журналах, индексируемых в базах данных *Web of Science, Scopus, Science Index*.

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

# Russian Journal of Biotherapy

Peer-reviewed theoretical and SCIENTIFIC AND PRACTICAL JOURNAL

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

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

FOUNDED IN 2002 by Professor A.Yu. Baryshnikov

4 VOL. 24  
'25

**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](mailto:biotherapy_rbj@mail.ru)  
[rjournal@ronc.ru](mailto:rjournal@ronc.ru)

**Publishing office:**

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

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

[www.abvpress.ru](http://www.abvpress.ru)

*Editor* Yu.N. Biriukova  
*Proofreader* T.N. Pomiluyko  
*Designer* E.V. Stepanova  
*Maker-up* O.V. Goncharuk

*The journal is registered at the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media*  
*Registration number: ПИ № 77-11695 dated 21.01.2002;*  
*ПИ № ФС77-53039 dated 04.03.2013*

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

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

Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal. 2025. Volume 24. No 4. 1–84.

© Design, layout PH "ABV-Press", 2025  
Rospechat' catalogue index: 81679.  
Printed in the printing house "Photobook Marketing" 107023, Russia, Moscow, Elektrozavodskaya str., 14, building 1.  
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 (Sechenovskiy 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 (Sechenovskiy 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, Major Researcher of Center of Clinical Pharmacology, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Health of Russia, Professor of Chair of Pharmacy, P.A. Nelyubin Institute of Pharmacy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenovskiy 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 (Sechenovskiy University) (Moscow, Russia)

**Krasnov, Viktor P.**, PhD, DSc, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, 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 Nizhegorodsky State University, Head of Laboratory of Immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (Nizhniy Novgorod, Russia)

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

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

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

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

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

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

**Titov, Konstantin S.**, MD, PhD, DSc, Professor, Leading researcher at the Moscow Multidisciplinary Scientific and Clinical Center named after S.P. Botkin of the Moscow Department of Health, Professor of the Department of Oncology and Radiology named after Academician V.P. Kharchenko of the Medical Institute of the 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 (Sechenovskiy 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

*В.Б. Маркеев, В.П. Виноградов, М.К. Седова, С.В. Тишков, К.В. Алексеев,  
Е.В. Блынская, В.Л. Дорофеев*

**Получение твердых дисперсий активных фармацевтических субстанций в условиях  
сверхкритического антирастворителя: особенности и перспективы метода . . . . . 10**

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*Д.М. Белов, А.Х. Бекяшев, Е.А. Москвина, Д.Р. Насхлеташвили, А.А. Борунова,  
В.А. Алешин, А.А. Митрофанов, Е.В. Прозоренко, М.М. Хатукаева,  
Р.А. Суфианов, Т.Н. Заботина*

**Лептоменингеальные метастазы рака молочной железы: клиничко-цитологические  
особенности на фоне интраоперационной терапии метотрексатом . . . . . 19**

*А.В. Султанбаев, И.А. Тузанкина, К.В. Меньшиков, А.Ф. Насретдинов,  
Н.И. Султанбаева, Ш.И. Мусин, А.А. Измайлов, М.В. Султанбаев,  
А.А. Измайлова, Е.А. Трошенков, Д.А. Кудлай*

**Значение уровня эксцизионных колец Т-клеточных рецепторов  
и κ-делеционного элемента рецептора В-клеток в эффективности  
терапии метастатического рака яичников . . . . . 31**

*А.И. Черткова, И.Б. Шоуа, А.А. Борунова, З.Г. Кадагидзе,  
С.Л. Гуторов, Т.Н. Заботина*

**Прогностическое значение интерлейкинов 6 и 8 в оценке эффективности терапии  
больных трижды негативным раком молочной железы . . . . . 39**

*Н.И. Рыжова, В.П. Дерягина, Л.А. Савлущинская, И.С. Голубева,  
Л.В. Кривошеева, К.И. Кирсанов*

**Противоопухолевый потенциал галловой кислоты на модели индуцированного  
1,2-диметилгидразином канцерогенеза . . . . . 47**

*Е.В. Санарова, Л.М. Борисова, М.П. Киселева, Л.Л. Николаева, Д.В. Гусев,  
В.Н. Осипов, О.Л. Орлова, И.С. Голубева, А.В. Ланцова*

**Первичная оценка противоопухолевой активности нового производного  
3-гидроксихиназолина — потенциального индуктора ферроптоза . . . . . 56**

*П.О. Фёдорова, И.О. Чикилева, А.И. Токатлы, А.И. Усов, М.И. Билан,  
Н.Э. Нифантьев, М.В. Киселевский*

**Особенности экспансии и иммунофенотипа первичной культуры НК- и НКТ-клеток  
человека под действием различных активаторов пролиферации . . . . . 64**

*О.В. Лебединская, П.А. Ковалева, А.И. Черемных, В.А. Львов, П.М. Качалина,  
Т.С. Спирина, Г. Бабаева, Н.В. Пашинцева, И.Н. Кабановская, Н.Ю. Анисимова*

**Опыт разработки погружных изделий для остеореконструкции  
с эффектом памяти формы и антибактериальной активностью  
на основе полилактида/гидроксиапатита . . . . . 77**

REVIEW

*Vladimir B. Markeev, Vladimir P. Vinogradov, Maria K. Sedova, Sergey V. Tishkov, Konstantin V. Alekseev, Evgenia V. Blynskaya, Vladimir L. Dorofeev*  
**Obtaining solid dispersions of active pharmaceutical ingredients under supercritical antisolvent conditions: features and prospects of the method** ..... 10

ORIGINAL REPORTS

*Dmitry M. Belov, Ali Kh. Bekyashev, Ekaterina A. Moskvina, David R. Naskhletashvili, Anna A. Borunova, Vladimir A. Alyoshin, Alexey A. Mitrofanov, Evgeny V. Prozorenko, Madina M. Khatukayeva, Rinat A. Sufianov, Tatiana N. Zabolina*  
**Leptomeningeal breast cancer metastases: clinical and cytological features on the background of intrathecal methotrexate therapy** ..... 19

*Alexander V. Sultanbaev, Irina A. Tuzankina, Konstantin V. Menshikov, Ainur F. Nasretdinov, Nadezhda I. Sultanbaeva, Shamil I. Musin, Adel A. Izmailov, Mikhail V. Sultanbaev, Angelina A. Izmailova, Evgeniy A. Troshenkov, Dmitry A. Kudlay*  
**The importance of the level of T-cell receptor excision circles and  $\kappa$ -deletion B-cell receptor excision circles in the effectiveness of therapy for metastatic ovarian cancer** ..... 31

*Antonina I. Chertkova, Ilona B. Shoua, Anna A. Borunova, Zaira G. Kadagidze, Sergey L. Gutorov, Tatiana N. Zabolina*  
**Prognostic value of interleukins 6 and 8 in assessing the effectiveness of therapy in patients with triple-negative breast cancer** ..... 39

*Natalia I. Ryzhova, Valentina P. Deryagina, Ludmila A. Savluchinskaya, Irina S. Golubeva, Leylya V. Krivosheeva, Kirill I. Kirsanov*  
**Antitumor potential of gallic acid on a model of 1,2-dimethylhydrazine-induced carcinogenesis** ..... 47

*Ekaterina V. Sanarova, Larisa M. Borisova, Marina P. Kiseleva, Ludmila L. Nikolaeva, Dmitriy V. Gusev, Vasiliy N. Osipov, Olga L. Orlova, Irina S. Golubeva, Anna V. Lantsova*  
**Primary evaluation of a new 3-hydroxyquinazoline derivative initial – a potential inducer of ferroptosis antitumour activity** ..... 56

*Polina O. Fedorova, Irina O. Chikileva, Alexandra I. Tokatly, Anatoly I. Usov, Maria I. Bilan, Nikolay E. Nifantiev, Mikhail V. Kiselevskiy*  
**Features of expansion and immunophenotype of primary culture of human NK and NKT cells under the influence of various proliferation activators** ..... 64

*Olga V. Lebedinskaya, Polina A. Kovaleva, Anna I. Cheremnykh, Vladislav A. Lvov, Polina M. Kachalina, Tatjana S. Spirina, Gulalek Babaeva, Natalia V. Pashintseva, Irina N. Kabanovskaia, Natalia Yu. Anisimova*  
**Experience in the development of immersible osteoarthritis devices with shape memory and antibacterial activity based on a polylactide/hydroxyapatite** ..... 77

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-10-18>

# Получение твердых дисперсий активных фармацевтических субстанций в условиях сверхкритического антирастворителя: особенности и перспективы метода

В.Б. Маркеев, В.П. Виноградов, М.К. Седова, С.В. Тишков, К.В. Алексеев,  
Е.В. Блынская, В.Л. Дорофеев

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»; Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8

**Контакты:** Владимир Борисович Маркеев [markeev\\_vb@academpharm.ru](mailto:markeev_vb@academpharm.ru)

**Введение.** Растворимость активных фармацевтических субстанций (АФС) в воде является одним из основных факторов, влияющих на их биодоступность. Для улучшения солюбилизации используют различные методы, в том числе микронизацию и создание твердых дисперсий. Применение метода быстрого расширения сверхкритических флюидов позволяет совместить положительные свойства данных подходов. Однако большинство АФС нерастворимы в основном соединении, используемом для создания флюида, – диоксиде углерода. По этой причине развитие получил метод кристаллизации в условиях сверхкритического антирастворителя (supercritical antisolvent crystallization, SAS), позволяющий микронизировать и создавать твердые дисперсии (ТД) для нерастворимых в диоксиде углерода соединений.

**Цель исследования** – анализ современных достижений в области создания ТД с аналогом метода быстрого расширения сверхкритических флюидов – метода SAS, в котором флюид используется в качестве антирастворителя, что существенно расширяет возможности использования данного подхода.

**Результаты.** Использование технологии SAS для создания ТД позволяет улучшить растворимость АФС за счет ее аморфизации и обеспечения растворимости на уровне выше равновесного значения. В качестве полимерного носителя в ТД используют в основном поливинилпирролидон и гидроксипропилметилцеллюлозу, а в качестве поверхностно-активного вещества – Pluronic® F-127, представляющий собой сополимер, состоящий из звеньев оксидов этилена и полипропилена. В роли растворителя часто применяют этанол или метанол, в том числе в смеси с дихлорметаном или метилхлоридом.

**Заключение.** Улучшение растворимости АФС путем создания методом SAS ТД позволяет существенно улучшить кинетику растворения. Несмотря на свою актуальность, процесс создания ТД методом SAS является достаточно сложным, зависящим как от свойств АФС, используемых полимеров и поверхностно-активных веществ, так и от параметров и характеристик процесса, начиная от температуры и давления процесса и заканчивая скоростью массопереноса и формой реактора и сопла.

**Ключевые слова:** твердая дисперсия, растворимость, флюидная технология, активная фармацевтическая субстанция, сверхкритический флюид

**Для цитирования:** Маркеев В.Б., Виноградов В.П., Седова М.К. и др. Получение твердых дисперсий активных фармацевтических субстанций в условиях сверхкритического антирастворителя: особенности и перспективы метода. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(4):10–8.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-10-18>

## Obtaining solid dispersions of active pharmaceutical ingredients under supercritical antisolvent conditions: features and prospects of the method

Vladimir B. Markeev, Vladimir P. Vinogradov, Maria K. Sedova, Sergey V. Tishkov, Konstantin V. Alekseev,  
Evgenia V. Blynskaya, Vladimir L. Dorofeev

Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies; 8 Baltiyskaya St., 125315 Moscow, Russia

**Contacts:** Vladimir Borisovich Markeev [markeev\\_vb@academpharm.ru](mailto:markeev_vb@academpharm.ru)

**Background.** The solubility of active pharmaceutical ingredients (API) in water is one of the main factors affecting their bioavailability. Various methods are used to improve solubilization, including micronization and the creation of solid dispersions. The use of the method of rapid expansion of supercritical fluids makes it possible to combine the positive properties of micronization and the creation of solid dispersions, however, most APIs are insoluble in the main compound used to create the fluid – carbon dioxide. For this reason, the method of crystallization under supercritical antisolvent (SAS) conditions has been developed, which makes it possible to micronize and create solid dispersions of compounds insoluble in carbon dioxide.

**Aim.** The analysis of modern achievements in the field of creating solid dispersions (SD) using an analogue of the method of rapid expansion of supercritical liquids – the SAS method, where the liquid is used as an anti-solvent, which significantly expands the possibilities of using this approach.

**Results.** The use of SAS technology to create SD makes it possible to improve the solubility of API by amorphizing it and ensuring solubility at a level above the equilibrium value. As a polymeric carrier in SD, polyvinylpyrrolidone and hydroxypropylmethylcellulose are mainly used, while as a surfactant, Pluronic® F-127 is employed, which represents a copolymer consisting of ethylene oxide and polypropylene units. Ethanol or methanol is often used as a solvent, including in a mixture with dichloroethane or methylene chloride.

**Conclusion.** Improving the solubility of API by creating a SD using the SAS method can significantly increase the kinetics of dissolution. Despite its relevance, the process of creating a TD using the SAS method is quite complex, depending both on the API, the polymers and surfactants used, as well as on the process parameters and characteristics, ranging from process temperature and pressure to the mass transfer rate and the shape of the reactor and nozzle.

**Keywords:** solid dispersion, solubility, fluid technology, active pharmaceutical ingredient, supercritical fluid

**For citation:** Markeev V.B., Vinogradov V.P., Sedova M.K. et al. Obtaining solid dispersions of active pharmaceutical ingredients under supercritical antisolvent conditions: features and prospects of the method. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2025;24(4):10–8. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-10-18>

## Введение

Растворимость активных фармацевтических субстанций (АФС) в воде является одним из основных факторов, влияющих на их биодоступность и абсорбцию веществ в организме, влияя на быстроту и полноту всасывания после приема внутрь. Примерно 40 % соединений, используемых в качестве АФС, и 70 % новых молекул-кандидатов относятся ко II и IV классам по Биофармацевтической системе классификации, демонстрируя плохую растворимость в воде [1–3]. Данное обстоятельство может приводить к неприемлемой терапевтической эффективности АФС, что является серьезной проблемой при разработке лекарственных препаратов (ЛП) и затрудняет их коммерциализацию [4].

Для повышения растворимости АФС используют различные методы, такие как микронизация, комплексообразование и создание твердых дисперсий (ТД). Улучшение растворения в ТД достигается как переводом АФС в аморфное состояние, так и путем заключения ее молекул внутри полимерного носителя (твердый раствор или аморфная ТД – АТД) и стабилизацией размера мелких частиц АФС внутри полимерной матрицы (стекловидная суспензия) [5]. К методам получения ТД можно отнести плавление, удаление растворителя, экструзию горячего расплава, лиофилизацию (сублимационная сушка), распылительную сушку и метод сверхкритических флюидов (СФ) [6–14]. Классические методы приготовления

ТД имеют много практических ограничений: методы, связанные с нагреванием, могут повлиять на физические свойства, стабильность полимера-носителя и АФС, часто вызывая их термолит [15, 16]. При использовании метода удаления растворителя необходимо подбирать общий для АФС и полимера растворитель и добиваться его последующего удаления, а также исключать риски, связанные с повторной кристаллизацией в процессе сушки [17]. При распылительной сушке АФС обычно получают в аморфном состоянии, которое сложно поддерживать [18]. Отметим, что метод СФ позволяет сохранить структуру полимера значительно лучше, чем сублимационная сушка [14]. В целом данная технология представляет собой новый подход к созданию ТД, позволяющий избежать большинства ограничений, встречающихся в других технологиях.

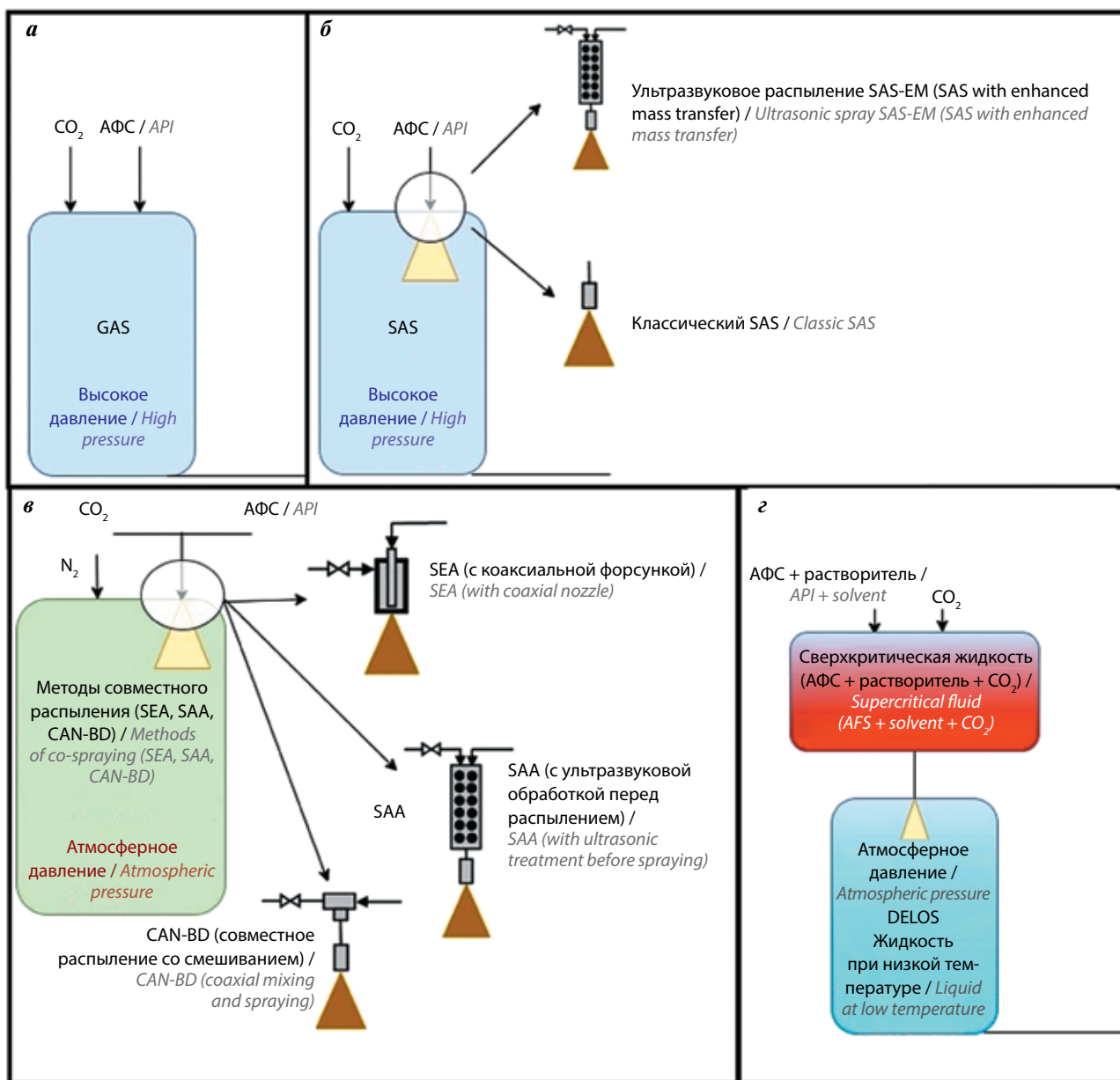
Метод СФ – это воздействие газом, который одновременно проявляет свойства газообразного и жидкого состояния при определенных условиях давления и температуры. Жидкостные свойства СФ обеспечивают эффективную сольubilization АФС и полимера, тогда как газообразные – способствуют диффузии молекул и испарению растворителя. Хотя теоретически почти все газы могут быть СФ, на практике используют только немногие из них из-за ограниченных возможностей достижения нужных температур и давления. Фактически более 98 % применения СФ связано с использованием диоксида углерода (CO<sub>2</sub>). Это

обусловлено с тем, что  $\text{CO}_2$  имеет низкие критическую температуру ( $31\text{ }^\circ\text{C}$ ) и давление ( $7,4\text{ МПа}$ ), что облегчает создание надлежащих условий для процесса СФ. Кроме того, газ негорюч, нетоксичен, недорог и относительно экологичен.

Недостатком использования методов на основе СФ для получения ТД является необходимость использования специальной установки. Более того,

большинство АФС (примерно 80 %) плохо растворяется в СФ  $\text{CO}_2$ , поэтому часто применяют технологии, в которых СФ  $\text{CO}_2$  выступает как антирастворитель (рис. 1).

Метод кристаллизации в условиях сверхкритического антирастворителя, или сокращенно метод SAS (supercritical antisolvent crystallization), – один из наиболее эффективных способов получения частиц



**Рис. 1.** Схема установки SAS (supercritical antisolvent crystallization) и ее различные модификации: а – GAS (gas antisolvent crystallization) – кристаллизация из газового антирастворителя; б – SAS; в – SEA (supercritical enhanced atomization – сверхкритическое усиленное диспергирование), SAA (supercritical assisted atomization – диспергирование с помощью сверхкритического флюида), CAN-BD (carbon dioxide assisted nebulization-bubble dryer – распылительная сушка с применением углекислого газа); з – DELOS (depressurization of an expanded liquid organic solution – сброс давления в расширенном растворе в органическом растворителе). АФС – активные фармацевтические субстанции

**Fig. 1.** The supercritical antisolvent crystallization (SAS) installation scheme and its various modifications: а – the GAS (gas antisolvent crystallization); б – the SAS; в – SEA (supercritical enhanced atomization), SAA (supercritical assisted atomization), CAN-BD (carbon dioxide assisted nebulization-bubble dryer); з – the DELOS (depressurization of an expanded liquid organic solution). API – active pharmaceutical ingredients

среди технологий СФ [19]. В процессе SAS раствор АФС (в том числе с поверхностно-активными веществами (ПАВ) или полимерами) вводится в СФ, который действует как антирастворитель. Это приводит к перенасыщению растворенного вещества, вследствие чего образуются зародыши кристаллов [20].

Кристаллизацию в общем можно рассматривать как процесс, состоящий из двух стадий, а именно нуклеации и роста кристаллов. Нуклеация – это образование небольших зародышей, где «ядро» относится к минимальному количеству новой кристаллической фазы, способной к независимому существованию. За образованием зародышей следует рост кристаллов из них.

Наиболее перспективными для улучшения растворимости АФС являются АД, способные сохранять свою гомогенность и аморфную форму в течение всего периода хранения. Фактически получение и обеспечение аморфности АФС внутри АД остается основной проблемой и является ограничивающим фактором их более широкого применения.

Преимущество подхода SAS заключается в том, что происходит распыление гомогенной смеси АФС с полимером. Это позволяет контролировать и модифицировать свойства АД. Во время процесса SAS микроструктура частиц может быть точно подобрана путем регулирования рабочих параметров, таких как температура, давление, природа органического растворителя, концентрация растворенных веществ, геометрия сопла и скорость потока раствора [20–23].

С физической точки зрения образование частиц в процессе SAS зависит от коэффициента массопереноса между содержащим капли растворенным веществом и СФ CO<sub>2</sub>, а также от скорости переноса

растворителя в фазу СФ CO<sub>2</sub> [24–29]. Таким образом, более высокая скорость массопереноса обеспечивает самопроизвольную нуклеацию и приводит к образованию частиц меньшего размера без агрегации [30, 31].

Однако процесс SAS обладает различными недостатками, такими как длительный период промывки и образование капель большего размера на кончике сопла, обуславливающими агрегацию частиц АФС [32–34]. Кроме того, засорение распылительной форсунки во время получения частиц может привести к их скоплению в расширительной камере, что в дальнейшем создает проблемы при очистке флюидной установки.

Стоит отметить, что часть связанных с методом SAS проблем можно преодолеть, смешивая дисперсионную систему с использованием ультразвука, в котором при высокой турбулентности внешние сдвигающие усилия могут существенно распылять и разбивать струю раствора на мельчайшие капли, а затем уменьшать размер частиц до субмикронного диапазона (см. рис. 1) [35–37]. К наиболее распространенным модификациям метода SAS относятся:

- SAS-DEM (supercritical antisolvent with drug-excipient mixing) – метод SAS с перемешиванием АФС и вспомогательных веществ;
- SAS-EM (supercritical antisolvent with enhanced mass transfer) – метод SAS с улучшенным массопереносом;
- GAS (gas antisolvent crystallization) – кристаллизация из газового антирастворителя;
- GASR (gas antisolvent recrystallization) – рекристаллизация газа с антирастворителем;
- GASP (gas antisolvent precipitation) – осаждение газом-антирастворителем;

**Таблица 1.** Примеры микронизированных активных фармацевтических субстанций, полученных методом кристаллизации в условиях сверхкритического антирастворителя

**Table 1.** Examples of micronized active pharmaceutical ingredients obtained by the supercritical antisolvent crystallization method

Активная фармацевтическая субстанция Active pharmaceutical ingredients	Растворитель Solvent	Размер частиц, нм Particle size, nm
Апигенин Apigenin	Диметилсульфоксид Dimethyl sulfoxide	400–800
Индинавир Indinavir	Ацетон Acetone	200–724
Моксифлоксацин Moxifloxacin	Диметилсульфоксид Dimethyl sulfoxide	330–8200
Амоксициллин Amoxicillin	N-метилпирролидон N-methylpyrrolidone	216–505
Лизоцим Lysozyme	Диметилсульфоксид Dimethyl sulfoxide	59–247
Ампициллин Ampicillin	Диметилсульфоксид, этанол Dimethyl sulfoxide, ethanol	100–300

- PCA (precipitation with a compressed fluid antisolvent) – осаждение сжатым жидким антирастворителем;
- SEDS (solution-enhanced dispersion of solids) – улучшенное диспергирование твердых частиц в растворе;
- SpEDS (suspension-enhanced dispersion by scCO<sub>2</sub>) – диспергирование суспензии с улучшенными за счет СФ СО<sub>2</sub> свойствами;
- SEDS-PA (solution-enhanced dispersion by supercritical fluids-prefilming atomization) – улучшенное диспергирование СФ с предварительным распылением;
- ASES (aerosol solvent extraction system) – метод удаления аэрозольного растворителя;
- ARISE (atomized rapid injection for solvent extraction) – метод быстрого впрыскивания в систему распыления с удалением растворителя;
- AAS (atomization and antisolvent crystallization) – метод распыления и кристаллизация в антирастворителе;
- SFEE (supercritical fluid extraction of emulsions) – метод эмульсионного сверхкритического распыления;
- ASAIS (atomization and supercritical antisolvent induced suspensions) – метод суспензионного сверхкритического распыления;
- ELAS (expanded liquid antisolvent) – метод расширения жидкого антирастворителя.

Примеры АФС, микронизированных методом SAS, представлены в табл. 1.

При создании ТД используют гидрофильные биосовместимые полимеры, такие как полиэтиленгликоль, полиметакрилат, гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ) и поливинилпирролидон (ПВП), которые могут не только ингибировать кристаллизацию, но и повышать смачивающую способность АФС при контакте с водной средой. На данный момент имеется достаточно большое количество работ, свидетельствующих об успешности применения метода SAS для создания ТД [35–42]. В основном в качестве носителя использовали ПВП и ГПМЦ, а в качестве ПАВ – Pluronic® F-127, представляющий собой сополимер, состоящий из звеньев оксидов этилена и полипропилена [35]. Технологические параметры, используемые полимеры и растворители представлены в табл. 2. В большинстве случаев удавалось получить АТД, сохраняющие некристаллическое состояние АФС в течение длительного времени.

В исследовании J. V. Ahn и соавт. методом ASES получены ТД фенофибрата, в результате чего кинетика растворения улучшилась до уровня  $95,1 \pm 2,5$  % [38]. Согласно данным рентгенофазового анализа и дифференциальной сканирующей калориметрии АФС в целом сохранила свою кристаллическую структуру, что говорит о возможности добиться

растворимости фенофибрата без перевода его в аморфную форму. Стоит отметить, что метод SAS позволил снизить остаточное содержание хлора в сравнении с классическим «удалением растворителя», что является его преимуществом.

При получении ТД итраконазола в работе S. Lee и соавт. носителем являлся ГПМЦ с типом замещения 2910, в качестве растворителя применяли смесь дихлорметана и этанола в соотношении 60:40 (по массе) [39]. Полученные АТД обладали полной аморфностью. Размер частиц АТД варьировался в пределах 100–500 нм, усредненный геометрический диаметр увеличивался при повышении давления и составлял 0,20, 0,25 и 0,38 мкм при давлении 10, 12 и 15 МПа соответственно. Это связано с образованием крупных пластинчатых частиц при высоких давлениях и не наблюдается при низких значениях. Если оценивать влияние температуры, то АТД, приготовленные при температуре 45 °С, немного меньше размером по сравнению с АТД, полученными при температуре 60 °С. Это может быть обусловлено тем, что плотность СФ при температуре 45 °С значительно выше, чем при температуре 60 °С.

В исследовании по созданию ТД сиролимуса в работе M. S. Kim и соавт. изучена возможность использования таких полимеров, как ГПМЦ, ПВП K30, ПВП VA 64, низковязкие типы гидроксипропилцеллюлозы SSL и SL, полиэтиленгликоля (ПЭГ) 6000 и ПЭГ 8000 в соотношении АФС: полимер = 1:4 (по массе) с применением в качестве растворителя этанола или смеси этанола и дихлорметана [40]. Для ТД ПЭГ-сиролимус выход составлял менее 10 % в виде микрочастиц неправильной формы размером 1–20 мкм. Использование ПВП VA64 (сополимера N-винилпирролидона и винилацетата в соотношении 6:4) не позволило получить ТД сиролимуса методом SAS. Возможной причиной стала низкая температурой стеклования ПЭГ 6000 и 8000 и ПВП VA64 при использовании СФ СО<sub>2</sub> в качестве пластификатора. Среди этих гидрофильных полимеров для дальнейшего изучения авторы выбрали ПВП (K30), поскольку он образует однородную матрицу, в которой АФС молекулярно диспергирован в носителе. Для улучшения растворимости АФС помимо полимера изучена возможность добавления ПАВ.

Полученные ТД ПВП-сиролимуса имели средний размер частиц – приблизительно 400 нм. Добавление в АТД лаурилсульфата или дистеарата сахарозы приводило к образованию сферических частиц без значительного увеличения их диаметра. Однако при добавлении в состав ТД с ПВП таких ПАВ, как витамин E, Gelucire 50/13 или полиоксиэтилена(40)моностеарат, размер частиц увеличивался. Из-за более низких температур плавления этих ПАВ наблюдали агрегацию частиц.

Таблица 2. Твердые дисперсии, полученные методом кристаллизации в условиях сверхкритического антирастворителя

Table 2. Solid dispersions created by the supercritical antisolvent crystallization method

Активная фармацевтическая субстанция Active pharmaceutical ingredients	Полимер Polymer	Время, мин Time, min	Растворитель Solvent	Расход CO <sub>2</sub> , мл/мин CO <sub>2</sub> consumption, ml/min	Расход раствора, мл/мин Solution consumption, ml/min	Давление, МПа Pressure, MPa	Температура, °C Temperature, °C
Ирбесартан Irbesartan	Pluronic® F-127	60–80	Этанол Ethanol	11–15	0,2–2	10–20	50
Фенофибрат Fenofibrate	Pluronic® F-127	60	Дихлорметан и этанол Dichloromethane and ethanol	–	5	9–15	50
Итраконазол Itraconazole	ГПМЦ HPMC	100	Дихлорметан и этанол Dichloromethane and ethanol	10	0,3	8–15	45–60
Пироксикам Piroxicam	ПВП (K25) PVP (K25)	40–60	Хлористый метилен Methylene chloride	30	1	9,65	40
Сиролимус Sirolimus	ПВП (K25) PVP (K25)	60	Дихлорметан и этанол Dichloromethane and ethanol	11	1	12	40
Мегэстролацетат Megestrol Acetate	ГПМЦ, ПВП HPMC, PVP	60	Дихлорметан и этанол dichloromethane and ethanol	11	1	15	40
Целекоксиб Celecoxib	ПВП/PVP (K25)	60	Метанол Methanol	11	1	15	40
Итраконазол Itraconazole	ПВП (K25), Pluronic® F-127 PVP (K25) Pluronic® F-127	–	Метанол и дихлорметан Methanol and dichloromethane	20	0,4	9,5	50
Азитромицин Azithromycin	ПЭГ 6000, Pluronic® PEG 6000, F-127 Pluronic® F-127	60–80	Этанол Ethanol	2	0,2	–	
Паклитаксел Paclitaxel	ПВП (K30), НСО-40 PVP (K30) НСО-40	–	Дихлорметан и этанол Dichloromethane and ethanol	10	0,3	8,27	40
Фелодипин Felodipine	ГПМЦ, НСО-60 HPMC НСО-60	–	Этанол и метиленхлорид Ethanol and methylene chloride	30	0,5	10	45
Телмисартан Telmisartan	ГПМЦ, ПВП (K30) HPMC, PVP (K30)	–	Этанол и метиленхлорид Ethanol and methylene chloride	–	–	12	45
Сульфадиазин Sulfadiazine	ПВП (K40) PVP (K40)	–	N,N-диметилацетамид и тетрагидрофуран N,N-dimethylacetamide and tetrahydrofuran	400	0,25	10	35

**Примечание.** ГПМЦ – гидроксипропилметилцеллюлоза; ПВП – поливинилпирролидон; ПЭГ – полиэтиленгликоль, НСО (НСО-60, НСО-40) – гидрогенизированное касторовое масло с полиоксиэтиленом.

**Note.** HPMC – hydroxypropylmethylcellulose; PVP – polyvinylpyrrolidone; PEG – polyethyleneglycol; HCO (HCO-60, HCO-40) – hydrogenated castor oil with polyoxyethylene.

В статье E.S. На и соавт. описано исследование мегестрола ацетата, показавшего значительное увеличение растворимости АФС в ТД с ГПМЦ по сравнению с ТД мегестрола ацетатом-ПВП [41]. Степень и скорость растворения мегестрола ацетата дополнительно росла после добавления ПАВ в состав ТД с ГПМЦ. Наиболее эффективным ПАВ оказался сложный эфир сахара Ryoto L1695, ему уступал сукцинат d- $\alpha$ -токоферилполиэтиленгликоля 1000. ТД наночастицы АФС-ГПМЦ-сложный эфир сахара Ryoto L1695 в соотношении 1:2:1 продемонстрировали быстрое растворение – до 95 % мегестрола ацетата в течение 30 мин. Кроме того, они обеспечивали хорошую биодоступность при пероральном приеме, что приводило к увеличению в 4 раза площади под кривой (0–24 ч) и максимальной концентрации АФС в крови в 5,5 раза по сравнению с исходным порошком мегестрола ацетата.

Все наночастицы АТД имели сферическую форму, а размер частиц составлял от 150 до 500 нм. При добавлении ПАВ размер частиц увеличивался, что приводило к уменьшению удельной площади поверхности. В частности, частицы мегестрола ацетата-ГПМЦ-витамина E демонстрировали некоторую агрегацию и имели удельную площадь поверхности 33,1 м<sup>2</sup>/г вследствие низкой температуры плавления витамина E (приблизительно 37 °C). Тем не менее средний размер всех наночастиц АТД мегестрола ацетата составлял менее 500 нм. Основной эндотермический пик мегестрола ацетата (218 °C) не наблюдали ни для одной из наночастиц АТД. Более того, мегестрола ацетат присутствовал в наночастицах АТД в аморфном (класс А-А) или молекулярно диспергированном состоянии (класс М-А).

В работе E. Adeli получали и анализировали ТД ирбесартана с ПАВ Pluronic® F-127 [42]. Полученные наноразмерные частицы имели диаметр 97 ± 19 нм. Равновесная растворимость исходного АФС в насыщенном виде составила 43,37 ± 0,75 мкг/мл. Для ТД результат составил 594,55 ± 1,40 мкг/мл, что примерно в 13 раз превышает этот показатель для кристаллов АФС.

Стоит отметить, что столь значимое повышение растворимости АФС достигалось не только за счет применения технологии ТД, но и благодаря солюбилизирующим свойствам ПАВ. Это подтверждают данные по растворимости механической смеси АФС и плуроника – полимерного соединения, представляющего собой блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена (94,77 мкг/мл). Исследование кинетики растворения показало, что из смеси в течение 60 мин высвобождалось

39,01 % ирбесартана, в то время как из ТД высвобождалось 98,34 % АФС [42].

В работе S.H. Khudaida и соавт. удалось получить ТД сульфадиазина с ПВП (K40) в виде наночастиц сферической формы со средним размером примерно 750 нм [43]. Среди 5 чистых растворителей и смеси N,N-диметилацетамида и тетрагидрофурана в 5 разных соотношениях (от 1:1 до 5:1) наиболее эффективной оказалась смесь в соотношении 4:1. Повышение температуры реактора выше 40 °C приводило к утере сферичности части АТД в процессе кристаллизации, увеличение давления значительно на процесс не влияло. Использование разных форсунок (с внутренним диаметром 100, 200 и 300 мкм) позволило выявить преимущество диаметра форсунки 100 мкм. Применение форсунки меньшего диаметра увеличивает скорость впрыскивания струи раствора, создавая сильный вихрь, который способствует интенсивному макросмешиванию и образованию более мелких частиц.

Образцы SAS, полученные при соотношении концентраций 2:1, 1:1 и 1:2, по-прежнему сохраняли небольшие кристаллические пики на рентгенограмме. Это указывало на то, что АФС полностью равномерно распределена в полимере и не перешла в аморфное состояние. Однако при соотношении концентраций 1:4 очевидно, что сульфадиазин перешел в однородное аморфное состояние, что свидетельствует об успешном получении АТД сульфадиазина с ПВП. При исследовании кинетики растворения сульфадиазина выявлено, что из физической смеси она составила примерно 30 % по прошествии 60 мин, в то время как степень для АТД, образованной с помощью SAS, соответствовала примерно 80 % за то же время. Кроме того, образец АТД демонстрировал большую скорость высвобождения в первые минуты теста, что может свидетельствовать о преимуществе аморфной формы АФС.

### Заключение

Таким образом, использование технологии SAS для создания ТД позволяет улучшить растворимость АФС II и IV классов по Биофармацевтической системе классификации и является перспективным направлением, с помощью которого возможно повысить биодоступность многих АФС и молекул-кандидатов. Однако процесс создания АТД методом SAS является достаточно сложным, зависящим как от АФС, используемых полимеров и ПАВ, так и от параметров и характеристик процесса, начиная от температуры и давления и заканчивая скоростью массопереноса и формой реактора и сопла.

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

- Lesutan V.L., Andersen S.K., Lamprou D.A. Poorly water-soluble APIs in fixed-dose combinations: development, challenges, and opportunities in manufacturing techniques. *J Drug Deliv Sci Technol* 2025;111:107212. DOI: 10.1016/j.jddst.2025.107212
- Benet L.Z., Broccatelli F., Oprea T.I. BDDCS applied to over 900 drugs. *AAPS J* 2011;13(4):519–47. DOI: 10.1208/s12248-011-9290-9
- Ku M.S. Use of the biopharmaceutical classification system in early drug development. *AAPS J* 2008;10(1):208–12. DOI: 10.1208/s12248-008-9020-0
- Kalepu S., Nekkanti V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm Sin B* 2015;5(5):442–53. DOI: 10.1016/j.apsb.2015.07.003
- Silva J.F.C., Rosado M.T.S., Maria T.M.R. et al. Introduction to pharmaceutical co-amorphous systems using a green co-milling technique. *J Chem Educ* 2023;100(4):1627–32. DOI: 10.1021/acs.jchemed.3c00036
- Al-Japairai K., Almurisi S.H., Mahmood S. et al. Strategies to improve the stability of amorphous solid dispersions in view of the hot melt extrusion (HME) method. *Int J Pharm* 2023;647:123536. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.123536
- Pisay M., Navti P.D., Rao V. et al. Investigation of drug-polymer miscibility and design of ternary solid dispersions for oral bioavailability enhancement by Hot Melt Extrusion. *JDDST* 2023;90:105107. DOI: 10.1016/j.jddst.2023.105107
- Hanada N., Higashi K., Zhao Z. et al. Preparation of a ternary amorphous solid dispersion using hot-melt extrusion for obtaining a stable colloidal dispersion of amorphous probucol nanoparticles. *Int J Pharm* 2023;640:122959. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.122959
- Atsukawa K., Amari S., Takiyama H. Solid dispersion melt crystallization (SDMC) concept using binary eutectic system for improvement of dissolution rate. *JIEC* 2021;101:21–7. DOI: 10.1016/j.jiec.2021.05.032
- Nyamba I., Jennotte O., Sombie C.B. et al. Preformulation study for the selection of a suitable polymer for the development of ellagic acid-based solid dispersion using hot-melt extrusion. *Int J Pharm* 2023;641:123088. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.123088
- Assis J.M.C., Barbosa E.J., Bezzon V.D.N. et al. Hot-melt extrudability of amorphous solid dispersions of flubendazole-copovidone: An exploratory study of the effect of drug loading and the balance of adjuvants on extrudability and dissolution. *Int J Pharm* 2022;614:121456. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2022.121456
- Boel E., Giacomini F., Mooter G.V. Solvent influence on manufacturability, phase behavior and morphology of amorphous solid dispersions prepared via bead coating. *Eur J Pharm Biopharm* 2021;167:175–88. DOI: 10.1016/j.ejpb.2021.07.013
- Schonfeld B., Westedt U., Wagner K.G. Vacuum drum drying – a novel solvent-evaporation based technology to manufacture amorphous solid dispersions in comparison to spray drying and hot melt extrusion. *Int J Pharm* 2021;596:120233. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120233
- Obaidat R.M., Tashtoush B.M., Awad A.A., Bustami R.T. Using Supercritical Fluid Technology (SFT) in preparation of tacrolimus solid dispersions. *AAPS J* 2017;18(2):481–93. DOI: 10.1208/s12249-016-0492-4
- Tran P.H.L., Lee B.J., Tran T.T.D. Recent studies on the processes and formulation impacts in the development of solid dispersions by hot-melt extrusion. *Eur J Pharm Biopharm* 2021;164:13–9. DOI: 10.1016/j.ejpb.2021.04.009
- Jiang J., Lu A., Ma X. et al. The applications of machine learning to predict the forming of chemically stable amorphous solid dispersions prepared by hot-melt extrusion. *Int J Pharm X* 2023;5:100164. DOI: 10.1016/j.ijpx.2023.100164
- Dohrn S., Luebbert C., Lehmkemper K. et al. Solvent influence on the phase behavior and glass transition of Amorphous Solid Dispersions. *Eur J Pharm Biopharm* 2021;158:132–42. DOI: 10.1016/j.ejpb.2020.11.002
- Dhumal G., Treffer D., Polli J.P. Concordance of vacuum compression molding with spray drying in screening of amorphous solid dispersions of itraconazole. *Int J Pharm* 2024;654:123952. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2024.123952
- Abuzar S.M., Hyun S.M., Kim J.H. et al. Enhancing the solubility and bioavailability of poorly water-soluble drugs using supercritical antisolvent (SAS) process. *Int J Pharm* 2018;538(1-2): 1–13. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.12.041
- Wu W.Y., Su C.S. Recrystallization and production of spherical submicron particles of sulfasalazine using a supercritical antisolvent process. *Crystals* 2018;8(7):295. DOI: 10.3390/cryst8070295
- Ojo A.T., Ma C., Lee P.I. Elucidating the effect of crystallization on drug release from amorphous solid dispersions in soluble and insoluble carriers. *Int J Pharm* 2020;591:120005. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.120005
- Franco P., Marco I. Nanoparticles and nanocrystals by supercritical CO<sub>2</sub>-assisted techniques for pharmaceutical applications: a review. *Appl Sci* 2021;11(4):1476. DOI: 10.3390/app11041476
- O'Sullivan A., Long B., Verma V. et al. Solid-state and particle size control of pharmaceutical cocrystals using atomization-based techniques. *Int J Pharm* 2022;621:121798. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2022.121798
- Vorobeia A.M., Parenago O.O. Using supercritical fluid technologies to prepare micro- and nanoparticles. *Russ J Phys Chem A* 2021;95(3):407–17. DOI: 10.1134/S0036024421030237
- Ha E.S., Park H., Lee S.K. et al. Pure trans-resveratrol nanoparticles prepared by a supercritical antisolvent process using alcohol and dichloromethane mixtures: effect of particle size on dissolution and bioavailability in rats. *Antioxidants (Basel)* 2020;9(4):342. DOI: 10.3390/antiox9040342
- Reverchon E., De Marco I. Mechanisms controlling supercritical antisolvent precipitate morphology. *Chem Eng J* 2011;169(1-3): 358–70. DOI: 10.1016/j.cej.2011.02.064
- Matos R.L., Lu T., Prosapio V. et al. Coprecipitation of curcumin/PVP with enhanced dissolution properties by the supercritical antisolvent process. *J CO<sub>2</sub> Util* 2019;30:48–62. DOI: 10.1016/j.jcou.2019.01.005
- Vorobei A.M., Fedorovskiy A.G., Kostenko M.O. et al. Micronization of levofloxacin hydrochloride by the supercritical antisolvent precipitation method from single-phase and two-phase CO<sub>2</sub>-acetone mixtures. *Russ J Phys Chem A* 2022;8(16): 1416–21. DOI: 10.1134/S1990793122080152
- Vorobei A.M., Pokrovskiy O.I., Ustinovich K.B. et al. Micronization of salbutamol sulfate by supercritical antisolvent precipitation: the effect of process parameters on the size and morphology of particles. *Russ J Phys Chem B* 2018;8(12):1240–8. DOI: 10.1134/S1990793118080146
- Trasi N.S., Bhujbal S.V., Zemlyanov D.Y. et al. Physical stability and release properties of lumefantrine amorphous solid dispersion granules prepared by a simple solvent evaporation approach. *Int J Pharm* 2020;2:100052. DOI: 10.1016/j.ijpx.2020.100052
- Newman A., Zografis G. Considerations in the development of physically stable high drug load API-polymer amorphous solid dispersions in the glassy state. *J Pharm Sci* 2023;112(1):8–18. DOI: 10.1016/j.xphs.2022.08.007
- Gao S., Li X., Jiang J. et al. Fabrication and characterization of thiophanate methyl/hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex nanofibers by electrospinning. *J Mol Liq* 2022;70(26):7911–20. DOI: 10.1016/j.molliq.2021.116228

33. Franco P., Reverchon E., De Marco I. PVP/ketoprofen coprecipitation using supercritical antisolvent process. *Powder Technol* 2018;340:1–7. DOI: 10.1016/j.powtec.2018.09.007
34. Franco P., Reverchon E., De Marco I. Zein/diclofenac sodium coprecipitation at micrometric and nanometric range by supercritical antisolvent processing. *J CO<sub>2</sub> Util* 2018;27:366–73. DOI: 10.1016/j.jcou.2018.08.015
35. Padrela L., Rodrigues M.A., Duarte A. et al. Supercritical carbon dioxide-based technologies for the production of drug nanoparticles/nanocrystals – a comprehensive review. *Adv Drug Deliv Rev* 2018;131:22–78. DOI: 10.1016/j.addr.2018.07.010
36. Marchand G., Avinash S., Masoud A. et al. Systematic review and meta-analysis of COVID-19 maternal and neonatal clinical features and pregnancy outcomes up to June 3, 2021. *AJOG Glob Rep* 2022;2(1):100049. DOI: 10.1016/j.xagr.2021.100049
37. Yoon T.J., Son W.S., Park H.J. et al. Tetracycline nanoparticles precipitation using supercritical and liquid CO<sub>2</sub> as antisolvents. *J Supercrit Fluids* 2016;107:51–60. DOI: 10.1016/j.supflu.2015.08.014
38. Ahn J.B., Kim D.H., Lee S.E. et al. Improvement of the dissolution rate and bioavailability of fenofibrate by the supercritical anti-solvent process. *Int J Pharm* 2019;564:263–72. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.04.051
39. Lee S., Nam K., Kim M.S. et al. Preparation and characterization of solid dispersions of itraconazole by using aerosol solvent extraction system for improvement in drug solubility and bioavailability. *Drug Efficacy* 2005;28:866–74. DOI: 10.1007/BF02977355
40. Kim M.S., Kim J.S., Park H.J. et al. Enhanced bioavailability of sirolimus via preparation of solid dispersion nanoparticles using a supercritical antisolvent process. *Int J Nanomed* 2011;6:2997–3009. DOI: 10.2147/IJN.S26546
41. Ha E.S., Kim J.S., Baek I.H. et al. Development of megestrol acetate solid dispersion nanoparticles for enhanced oral delivery by using a supercritical antisolvent process. *Drug Des Dev Ther* 2015;9:4269–77. DOI: 10.2147/DDDT.S90706
42. Adeli E. The use of supercritical anti-solvent (SAS) technique for preparation of Irbesartan-Pluronic® F-127 nanoparticles to improve the drug dissolution. *Powder Technol* 2016;298:65–72. DOI: 10.1016/j.powtec.2016.05.004
43. Khudaida S.H., Dai Z.Z., Ciou J.M., Su C.S. Designing amorphous solid nanoparticle dispersion of sulfadiazine in polyvinylpyrrolidone using supercritical CO<sub>2</sub> as the antisolvent. *Adv Powder Technol* 2024;35(9):104592. DOI: 10.1016/j.appt.2024.104592

#### Вклад авторов

В.Б. Маркеев, В.П. Виноградов, Е.В. Блынская: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи;  
М.К. Седова, С.В. Тишков: обзор публикаций по теме статьи, анализ данных литературы, литературное редактирование;  
К.В. Алексеев, В.Л. Дорофеев: обзор публикаций по теме статьи, анализ данных литературы.

#### Author's contributions

V.B. Markeev, V.P. Vinogradov, E.V. Blynskaya: development of the study design, writing the text of the manuscript;  
M.K. Sedova, S.V. Tishkov: review of publications on the topic of the article, analysis of literary data, literary editing;  
K.V. Alekseev, V.L. Dorofeev: review of publications on the topic of the article, analysis of literary data.

#### ORCID авторов / ORCID of authors:

В.Б. Маркеев / V.B. Markeev: <https://orcid.org/0000-0003-2930-9397>  
В.П. Виноградов / V.P. Vinogradov: <https://orcid.org/0000-0001-8726-6407>  
М.К. Седова / M.K. Sedova: <https://orcid.org/0000-0002-2578-9437>  
С.В. Тишков / S.V. Tishkov: <https://orcid.org/0000-0002-8321-6952>  
К.В. Алексеев / K.V. Alekseev: <https://orcid.org/0000-0003-3506-9051>  
Е.В. Блынская / E.V. Blynskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9494-1332>  
В.Л. Дорофеев / V.L. Dorofeev: <https://orcid.org/0009-0004-3584-3742>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках темы государственного задания FGFG-2025-0005 «Дизайн, синтез и изучение оригинальных селективных ингибиторов матриксной металлопротеиназы 2-го типа с целью создания средств для лечения онкологических заболеваний».

**Funding.** The research was carried out within the framework of the scientific project FGFG-2025-0005 “Design, synthesis and study of original selective inhibitors of matrix metalloproteinase type 2 in order to create drugs for the treatment of oncological diseases”.

Статья поступила: 06.12.2024. Принята к публикации: 13.08.2025. Опубликовано онлайн: 10.12.2025.

Article submitted: 06.12.2024. Accepted for publication: 13.08.2025. Published online: 10.12.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-19-30>

# Лептоменингеальные метастазы рака молочной железы: клинико-цитологические особенности на фоне интратекальной терапии метотрексатом

Д.М. Белов<sup>1</sup>, А.Х. Бекашев<sup>1,2</sup>, Е.А. Москвина<sup>1</sup>, Д.Р. Насхлеташвили<sup>1</sup>, А.А. Борунова<sup>1</sup>, В.А. Алешин<sup>1</sup>, А.А. Митрофанов<sup>1</sup>, Е.В. Прозоренко<sup>3</sup>, М.М. Хатукаева<sup>1</sup>, Р.А. Суфианов<sup>1,3</sup>, Т.Н. Заботина<sup>1</sup>

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

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

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

**Контакты:** Дмитрий Михайлович Белов [dmbelov@mail.ru](mailto:dmbelov@mail.ru)

**Введение.** Цитологическое исследование ликвора и динамика неврологической симптоматики являются ведущими в диагностике и оценке эффективности лечения при лептоменингеальном метастазировании. Количественная оценка циркулирующих опухолевых клеток в ликворе не используются в рутинной практике. В работе прослежена корреляция динамики количества опухолевых клеток в ликворе с динамикой неврологической симптоматики у пациенток с лептоменингеальными метастазами рака молочной железы (РМЖ) в период проведения интратекальной терапии метотрексатом.

**Цель исследования** – выявить клинико-цитологические особенности у пациенток с лептоменингеальными метастазами РМЖ в процессе интратекальной терапии метотрексатом.

**Материалы и методы.** Ретроспективный анализ 30 пациенток с лептоменингеальными метастазами РМЖ, получавших интратекальное введение метотрексата в отделении нейроонкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина с 2018 по 2024 г.

**Результаты.** Во всех 30 случаях РМЖ был протокового или долькового типа. Наибольшее число пациенток с лептоменингеальными метастазами встречалось при IIIС-стадии РМЖ (10/30; 33,3 %). Цитологический анализ ликвора и оценку неврологического статуса проводили перед каждым введением метотрексата. Корреляция была прослежена на всем протяжении лечения. Выявлена прямая статистически значимая зависимость количества опухолевых клеток в ликворе и степени выраженности неврологических нарушений: через 1 мес от начала лечения  $r = 0,702$ ;  $p = 0,000$  и через 2 мес –  $r = 0,819$ ;  $p = 0,000$ . Однако до начала терапии зависимость между этими показателями отсутствовала ( $r = 0,056$ ;  $p = 0,770$ ). Так, при невысоком уровне опухолевого цитоза могла быть выраженная неврологическая симптоматика (75 клеток, симптоматика – 6 баллов) и, наоборот, при повышенном уровне цитоза могли быть легкие неврологические проявления (400 клеток, симптоматика – 3 балла). Обнаружено, что только при уменьшении количества опухолевых клеток в ликворе в 2 раза и более меняется степень выраженности неврологических нарушений. Увеличение выраженности неврологических нарушений происходит в случае повышения количества клеток в ликворе в 1,2 раза. Причем такая корреляция сохранялась на всем протяжении лечения.

**Заключение.** Оценка динамики опухолевого цитоза в ликворе наряду с клинической характеристикой могут быть рекомендованы к использованию в прогнозе ответа на лечение у пациенток с лептоменингеальными метастазами РМЖ.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, лептоменингеальный метастаз, интратекальная химиотерапия, цитологическая диагностика ликвора, клинико-цитологическая корреляция

**Для цитирования:** Белов Д.М., Бекашев А.Х., Москвина Е.А. и др. Лептоменингеальные метастазы рака молочной железы: клинико-цитологические особенности на фоне интратекальной терапии метотрексатом. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(4):19–30.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-19-30>

## Leptomeningeal breast cancer metastases: clinical and cytological features on the background of intrathecal methotrexate therapy

Dmitry M. Belov<sup>1</sup>, Ali Kh. Bekyashev<sup>1,2</sup>, Ekaterina A. Moskvina<sup>1</sup>, David R. Naskhletashvili<sup>1</sup>, Anna A. Borunova<sup>1</sup>, Vladimir A. Alyoshin<sup>1</sup>, Alexey A. Mitrofanov<sup>1</sup>, Evgeny V. Prozorenko<sup>3</sup>, Madina M. Khatukayeva<sup>1</sup>, Rinat A. Sufianov<sup>1,3</sup>, Tatiana N. Zabolina<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia; bld. 1, 2/1 Barrikadnaya St., Moscow 125993, Russia;

<sup>3</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenovskiy University), Ministry of Health of Russia; bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

**Contacts:** Dmitry Mikhailovich Belov [dmbelov@mail.ru](mailto:dmbelov@mail.ru)

**Background.** Cytological examination of cerebrospinal fluid (CSF) and the dynamics of neurological symptoms are key in the diagnosis and evaluation of treatment effectiveness for leptomeningeal metastases. Quantitative assessment of circulating tumor cells in CSF is not routinely used. This study examined the correlation between the dynamics of tumor cell counts in CSF and the dynamics of neurological symptoms in patients with leptomeningeal metastases from breast cancer during intrathecal methotrexate therapy.

**Aim.** To identify clinical and cytological features in patients with leptomeningeal metastases from breast cancer during intrathecal methotrexate therapy.

**Materials and methods.** A retrospective analysis of 30 patients with leptomeningeal metastases from breast cancer who received intrathecal methotrexate in the Department of Neurooncology of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology from 2018 to 2024.

**Results.** All 30 cases involved women with ductal or lobular breast cancer. The highest proportion of patients with leptomeningeal metastases were found in stage III–C breast cancer (33.3 %). Cytological analysis of cerebrospinal fluid and neurological status assessment were performed before each methotrexate administration. The correlation was monitored throughout the treatment period. A direct statistically significant relationship has been found between the number of tumor cells in cerebrospinal fluid and the severity of neurological disorders: at one month after treatment start  $r = 0.702$ ;  $p = 0.000$  and at two months  $r = 0.819$ ;  $p = 0.000$ . However, prior to therapy initiation there was no correlation between these parameters ( $r = 0.056$ ;  $p = 0.770$ ). Thus, with a low level of tumor cytosis pronounced neurological symptoms could be present (75 cells, symptom score – 6 points), while conversely, with an elevated cytosis level mild neurological manifestations might occur (400 cells, symptom score – 3 points). It was found that only with a decrease in the number of tumor cells in the cerebrospinal fluid by 2 or more times (or by 50 %) does the severity of neurological disorders change. And an increase in the severity of neurological disorders occurs in the case of an increase in the number of cells in the cerebrospinal fluid by 1.2 times (or by 20 %). Moreover, this correlation was maintained throughout the treatment.

**Conclusion.** Evaluation of the dynamics of tumor cytosis in the cerebrospinal fluid, along with clinical characteristics, can be recommended for use in predicting the response to treatment in patients with leptomeningeal metastases of breast cancer.

**Keywords:** breast cancer, leptomeningeal metastas, intrathecal chemotherapy, cerebrospinal fluid cytological diagnostics, clinical-cytological correlation

**For citation:** Belov D.M., Bekyashev A.Kh., Moskvina E.A. et al. Leptomeningeal breast cancer metastases: clinical and cytological features on the background of intrathecal methotrexate therapy. *Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2025;24(4):19–30. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-19-30>

### Введение

Лептоменингеальное метастазирование — состояние, при котором опухолевые клетки распространяются в пределах субарахноидального пространства и оболочек головного и/или спинного мозга, преимущественно мягкой [1]. Вопрос о терминологии диффузного опухолевого поражения мозговых оболочек давно был предметом обсуждения и различной трактовки. S. Maass в 1903 г. впервые назвал это забо-

левание канцероматозным менингитом, представив 18 обобщенных случаев диффузного поражения мозговых оболочек опухолевыми клетками [2]. Позднее различные авторы именовали его канцероматозным пахименингитом (исследования И. Г. Томсона, 1936 г., Н.М. Иценко, 1949 г.), раковым псевдоменингитом, псевдопахименингитом (Л.И. Смирнов, 1951 г.), энцефалической формой канцероматоза (В. J. Alpers, 1938 г., L. Madow, 1951 г.). При этом авторы предложенных

терминов признавали их неудачными, так как изменения в мозге не носили воспалительного характера. Наиболее правильным названием данной формы метастатического рака был признан термин «диффузный канцероматоз мозговых оболочек», в основном мягкой [3]. В настоящее время в литературе больше распространен термин «лептоменингеальные метастазы» (лептоменинкс – leptomeninx, от греч. leptos – «тонкий, нежный» + mēnix – «мозговая оболочка»).

Большой вклад в изучение оболочек головного мозга внес выдающийся отечественный ученый М.А. Барон, который в работе «Атлас функциональной стереоморфологии мозговых оболочек» подробно описал морфологическое строение мозговых оболочек, субарахноидального пространства в норме и при его метастатическом поражении [4]. Лептоменингеальные метастазы являются частым осложнением онкологического процесса, встречающегося в 5–10 % случаев солидного рака, чаще всего при раке молочной железы (РМЖ), раке легких и меланоме. Примечательно, что 100 лет назад наиболее частым источником опухолевого поражения оболочек головного и спинного мозга был рак желудка [2]. При патолого-анатомическом исследовании поражение мозговых оболочек выявляется в 19 % случаев у онкологических больных, имевших при жизни неврологические симптомы [5, 6]. Наибольшее число поражений оболочек головного мозга при солидных опухолях отмечается при РМЖ, которое растет по мере увеличения продолжительности жизни пациентов. Эта частота может быть недооценена из-за сложности диагностики и относительно высокой частоты ложноотрицательных цитологических результатов при люмбальной пункции [1, 7]. Пациенты с трижды негативным РМЖ имеют относительно более высокий риск развития лептоменингеальных метастазов, чем больные с другими типами РМЖ [8]. Метастазирование в субарахноидальное пространство может происходить путем гематогенного распространения, через венозное сплетение Бэтсона, периневрально, периваскулярно, а также путем прямого распространения из церебральных или спинальных паренхиматозных метастазов, контактирующих с цереброспинальной жидкостью [9]. Медиана выживаемости при лептоменингеальном поражении низкая и без лечения ограничена 6–8 нед [10]. Факторы негативного прогноза включают прогрессирующее системное заболевание, выраженную неврологическую симптоматику, поражение черепных нервов [11].

Терапевтической целью для пациентов с лептоменингеальными метастазами является улучшение выживаемости и качества их жизни путем задержки прогрессирования неврологической симптоматики. Специфическое лечение включает следующие виды терапии: системную, интратекальную (метотрекса-

том), лучевую [12, 13]. При оценке динамики заболевания неврологический статус пациента оценивается по системе NANO-LM (Neurologic Assessment in Neuro-Oncology scale) [14], а динамика данных нейровизуализации – по системе группы RANO (Response Assessment in Neuro-Oncology criteria) [15]. При цитологической оценке большинство авторов используют бинарную (качественную) систему оценки цитологического результата, а именно присутствие/отсутствие опухолевых клеток в ликворе [16]. Количественная оценка циркулирующих опухолевых клеток в ликворе не используется в рутинной практике в связи с особенностями циркуляции ликвора, неравномерным распределением опухолевых клеток в субарахноидальном пространстве. В нашей работе мы попытались проследить корреляцию между количеством опухолевых клеток в ликворе и неврологической симптоматикой у пациенток с лептоменингеальными метастазами РМЖ, получавших интратекальную терапию метотрексатом.

**Цель исследования** – выявить клинико-цитологические особенности у пациенток с лептоменингеальными метастазами РМЖ во время интратекальной терапии метотрексатом.

## Материалы и методы

### Пациентки

Проведен ретроспективный анализ клинико-лабораторных данных 30 пациенток с лептоменингеальными метастазами РМЖ, получивших лечение в отделении нейроонкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина с 2018 по 2024 г. Больные получали интратекальное введение химиопрепарата (метотрексат 15 мг). Всем пациенткам выполняли исследование на наличие и количество опухолевых клеток в ликворе до лечения и в его процессе. Забор ликвора проводили посредством люмбальной пункции между остистыми отростками L<sub>II</sub>–L<sub>III</sub> позвонков, выводили 3 мл цереброспинальной жидкости, которую отправляли на цитологическое и/или иммуноцитохимическое исследование. Абсолютным противопоказанием к проведению пункции являлась выраженная внутричерепная гипертензия, в исследовании такие пациентки не включены. Далее вводили химиопрепарат Методжект (метотрексат) – готовый раствор для инъекций в дозе 15 мг – 1,5 мл. Медиана длительности проводимой интратекальной химиотерапии метотрексатом составила 11,9 мес. Оценку эффективности проводимой терапии осуществляли на основании 3 критериев.

### Цитологическое исследование ликвора (цитологическое и/или иммуноцитохимическое)

Проводили качественную (присутствие/отсутствие опухолевых клеток в ликворе) и количественную

оценку (число опухолевых клеток в стандартном объеме образца биоматериала — 3 мл).

### Неврологическая симптоматика (по критериям NANO-LM)

Данные нейровизуализации: магнитно-резонансная томография (МРТ) головного мозга с контрастным усилением, выполненная на аппарате мощностью не менее 1,5 Тл (оценка по критериям RANO).

### Цитологическая диагностика

Подсчет количества опухолевых клеток в ликворе проводили до начала лечения и перед каждым введением метотрексата. Готовили цитоспиновые препараты (центрифуга Cytospin-3) с последующей окраской по Лейшману. В норме в ликворе присутствуют 2 типа клеток — моно- и лимфоциты. При метастатическом поражении оболочек цитологическая картина может быть разной, это зависит от гистологической формы опухоли. При метастазе РМЖ опухолевые клетки могут быть в крупных скоплениях, как при протоковом раке, и разрозненно лежащие, как при дольковом раке. Проводили подсчет опухолевых клеток в каждом поле зрения, включая единичные клетки. Также учитывали клеточность материала, полиморфизм и гиперхромность ядер, митозы, ядерно-цитоплазматическое соотношение, наличие вакуолей, структуру хроматина, цитоплазматические мостики между клетками опухоли.

Для дифференциальной диагностики метастатических поражений используется иммуноцитохимическое исследование. Высокочувствительным маркером для подтверждения диссеминации РМЖ является GATA-3 (транскрипционный фактор). Кроме того, используется оценка экспрессии как рецепторов эстрогенов, так и рецепторов прогестерона.

Поскольку в данной выборке не было нормального распределения для показателей опухолевых клеток, неврологического статуса, продолжительности терапии и общей выживаемости, статистическую обработку проводили с использованием непараметрических критериев. Для выявления взаимосвязи между показателями применяли анализ парной корреляции по Спирмену. Уровень статистической значимости был определен как  $p < 0,05$ . Статистическую обработку проводили с помощью пакета статистических программ SPSS 17.0.

### Результаты и обсуждение

В исследование включены 30 пациенток с верифицированным диагнозом протокового или долькового РМЖ. По стадии заболевания и рецепторному статусу первичной опухоли пациентки распределились следующим образом (табл. 1).

**Таблица 1.** Рецепторный статус первичной опухоли и стадия заболевания раком молочной железы

Table 1. Receptor status of the primary tumor and disease stage of breast cancer

Параметр	Число пациенток Number of patients	
	абсолютное absolute	относительное, % relative, %
<b>Рецепторный статус первичной опухоли</b> Receptor status of the primary tumor		
Люминальный А Luminal A	0	0
Люминальный В, HER2-отрицательный Luminal B, HER2 negative	13	43,0
Люминальный В, HER2-положительный Luminal B, HER2 positive	4	13,0
HER2-положительный HER2 positive	2	7,0
Тройной негативный Triple negative	11	37,0
<b>Стадия заболевания при верификации первичной опухоли</b> The stage of the disease at the time of verification of the primary tumor		
IA	2	6,7
IB	1	3,3
IIA	4	13,3
IIВ	4	13,3
IIIA	3	10,0
IIВ	3	10,0
IIС	10	33,4
IV	3	10,0

Как видно из приведенной таблицы, на момент постановки диагноза наибольшее число пациенток с лептоменингеальными метастазами встречались при стадии IIС (10/30; 33,4 %). По рецепторному статусу первичной опухоли преобладали пациентки с люминальным В HER2-отрицательным статусом (13/30; 43,0 %) и тройным негативным статусом (11/30; 37,0 %). В исследуемой группе пациентки с люминальным А биологическим подтипом опухоли отсутствовали.

Проведен анализ периода развития лептоменингеальных метастазов при динамическом наблюдении пациенток с момента выявления первичной опухоли. Так, у 2 (2/30; 6,7 %) пациенток лептоменингеальные метастазы обнаружены синхронно с первичной опухолью. Сроки выявления лептоменингеальных

Таблица 2. Сроки выявления лептоменингеальных метастазов с момента диагностики первичной опухоли

Table 2. Timeframe for detection of leptomeningeal metastases from diagnosis of the primary tumor

Число пациенток Number of patients	Период, мес Period, month											
	0	12	24	36	48	60	84	96	120	132	180	240
Абсолютное Absolute	2	4	10	2	2	3	1	2	1	1	1	1
Относительное, % Relative, %	6,7	13,3	33,4	6,7	6,7	10,0	3,3	6,7	3,3	3,3	3,3	3,3

Таблица 3. Экстракраниальные и церебральные (паренхиматозные) метастазы рака молочной железы

Table 3. Extracranial and cerebral (parenchymatous) metastases of breast cancer

Показатель Indicator	Число пациенток Number of patients	
	абсолютное absolute	относительное, % relative, %
<b>Экстракраниальные метастазы</b> Extracranial metastases		
Есть, в стадии прогрессирования Yes, in the progression stage	13	43,4
Есть, в стадии стабилизации Yes, in the stabilization stage	7	23,3
Нет No	10	33,3
<b>Церебральные (паренхиматозные) метастазы</b> Cerebral (parenchymatous) metastases		
Есть, до развития лептоменингеальных метастазов оперированы Yes, operated on before the development of leptomeningeal metastases	7	23,3
Есть, до развития лептоменингеальных метастазов НЕ оперированы Yes, they were NOT operated on before the development of leptomeningeal metastases	8	26,7
Нет No	15	50

метастазов от первичной диагностики опухоли представлены в табл. 2.

Наибольший период от диагностики первичной опухоли до развития лептоменингеальных метастазов отмечался при статусе лимфатических узлов N0 или N1. Наименьший период или синхронное поражение отмечалось при N3-статусе лимфатических узлов.

Наличие экстракраниальных и церебральных (паренхиматозных) метастазов РМЖ показано в табл. 3.

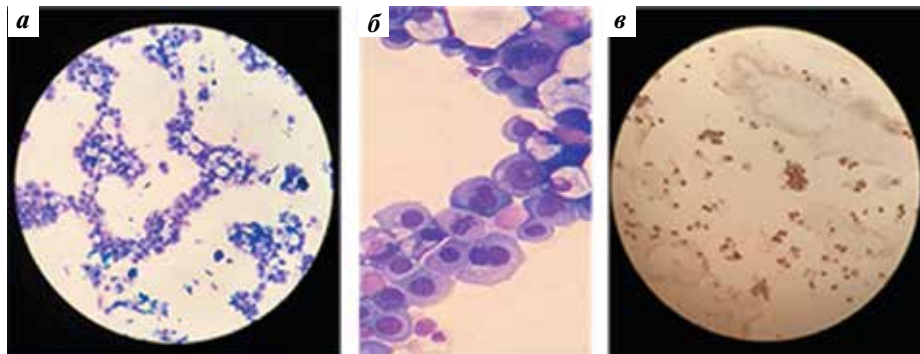
У большинства пациенток на момент диагностики лептоменингеальных метастазов имелось прогрессирование на экстракраниальном уровне (13/30; 43,4 %). Солитарное поражение (только оболочки головного мозга) имели 10 пациенток (10/30; 33,3 %). Половина пациенток (15/30; 50,0 %) имели церебральные метастазы, из них на супратенториальном уровне – 53,3 % (8/15), на субтенториальном уровне (мозжечок) – 33,3 % (5/15), на супрасубтенториальном уровне – 6,7 % (2/15). У 7 из 15 (46,7 %) человек церебральные метастазы были удалены до диагностики канцероматоза.

По результатам цитологического исследования ликвора опухолевые клетки выявлены у всех пациенток до начала лечения. Оценивалось не только наличие опухолевых клеток, но и их количество в стандартной порции ликвора (3 мл). Единичные (до 10) опухолевые клетки в ликворе были у 4 (4/30; 13,3 %) больных. У остальных пациенток количественный разброс опухолевых клеток колебался от 20 до 550. Динамическое цитологическое исследование ликвора с подсчетом опухолевых клеток проводилось перед каждым введением метотрексата. В качестве примера представлено цитологическое и иммуноцитохимическое исследование ликвора (рис. 1).

#### Данные нейровизуализации

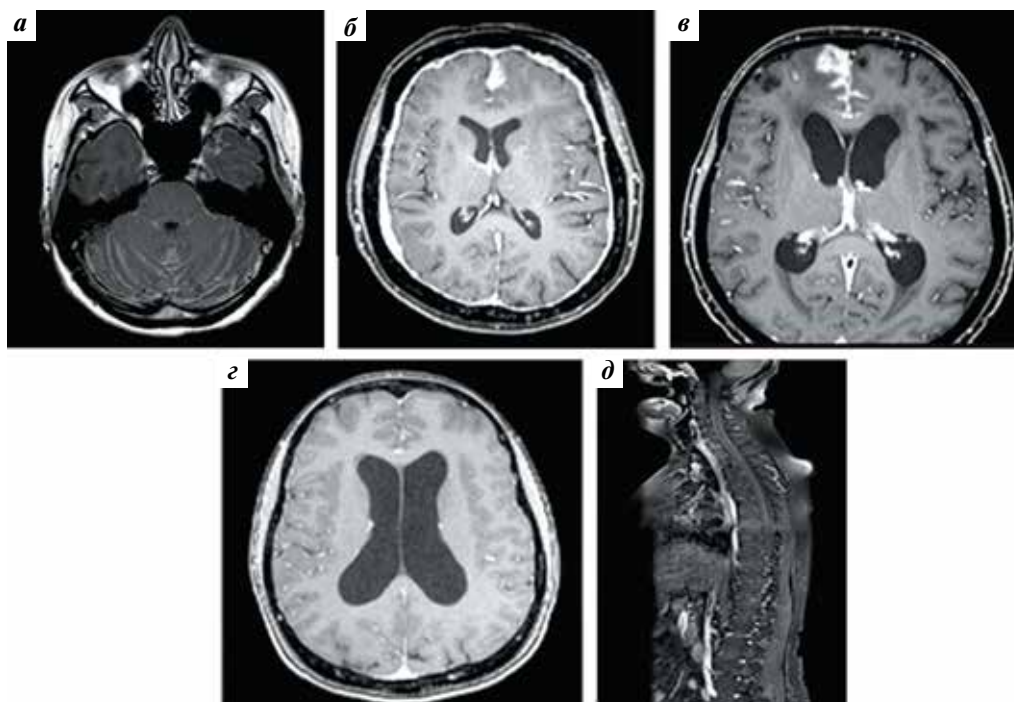
Во всех случаях диагноз был подтвержден данными нейровизуализации – МРТ головного мозга с контрастным усилением, выполненной на аппарате мощностью 1,5 Тл. Поскольку рентгенологические признаки, типичные для лептоменингеального поражения, как правило, малы по объему и сложны по геометрии, современная технология МРТ не позволяет проводить количественную оценку имеющихся изменений (рис. 2).

По данным МРТ у одной пациентки могли сочетаться как различные уровни поражения (головной, спинной мозг), так и различные формы поражения (диффузное и узловое лептоменингеальное накопление



**Рис. 1.** Цитологический анализ опухолевых клеток в ликворе: а, б – цитологическое исследование, окраска по Лейшману ( $\times 10$  и  $40$ ); в – иммуноцитохимическое исследование, экспрессия GATA-3

**Fig. 1.** Cytological analysis of tumor cells in cerebrospinal fluid: а, б – cytological examination, Leishman staining ( $\times 10$  and  $40$ ); в – immunocytochemistry, GATA-3 expression



**Рис. 2.** Лептоменингеальные метастазы на различных уровнях (магнитно-резонансная томография головного и спинного мозга, T1-режим с контрастным усилением): а – лептоменингеальное поражение в задней и средней черепных ямках у пациентки с раком молочной железы, аксиальная проекция; б – лептоменингеальное поражение на супратенториальном уровне у пациентки с раком молочной железы, аксиальная проекция; в – лептоменингеальное поражение передней трети фалкса с сопутствующей гидроцефалией у пациентки с раком молочной железы, аксиальная проекция; г – гидроцефалия у пациентки с раком молочной железы, аксиальная проекция; д – лептоменингеальные метастазы на шейном и грудном уровнях спинного мозга у пациентки с раком молочной железы, сагиттальная проекция

**Fig. 2.** Leptomeningeal metastases at various levels (magnetic resonance imaging of the brain and spinal cord, T1 contrast-enhanced): а – leptomeningeal lesion in the posterior and middle cranial fossa in a patient with breast cancer, axial view; б – leptomeningeal lesion at the supratentorial level in a patient with breast cancer, axial view; в – leptomeningeal lesion of the anterior third of the falx with concomitant hydrocephalus in a patient with breast cancer, axial view; г – hydrocephalus in a patient with breast cancer, axial view; д – leptomeningeal metastases at the cervical and thoracic spinal cord levels in a patient with breast cancer, sagittal view

контрастного вещества, гидроцефалия, поражение нервных корешков).

#### Неврологический статус пациенток

В настоящее время не до конца решенной задачей является оценка неврологического статуса у пациен-

тов с лептоменингеальными метастазами, поскольку неврологическая симптоматика может быть связана не только с лептоменингеальными метастазами, но и с церебральными (паренхиматозными) метастазами, а также может быть последствием ранее перенесенной нейрохирургической операции. Такие симптомы,

как чувствительные нарушения, часто являются следствием сопутствующей лекарственной полиневропатии, некоторые симптомы могут быть результатом радионекроза после проведенной радиотерапии, радиохирургии. Наибольшее распространение в оценке неврологического статуса в нейроонкологии получила шкала NANO. Однако она не подходит для пациентов с лептоменингеальным поражением, поскольку не включает в себя ряд ведущих симптомов, таких как тошнота, рвота, расстройства тазовых функций, однако учитывает те, которые не являются значимыми при лептоменингеальном поражении – чувствительные нарушения. Группа RANO-LM в 2025 г. предложила обновленную оценочную шкалу для клинической оценки лептоменингеальных метастазов – NANO-LM [19]. В ней оцениваются 14 функций, такие как уровень сознания, когнитивные функции, тошнота и рвота, зрение, движение глаз, сила мышц лица, слух, глотание, речь, мышечная сила, атаксия конечностей, походка, симптомы синдрома конского хвоста кишечника и мочевого пузыря. Оценка каждой функции определяется баллами от 0 до 2: чем выше балл, тем более выражена неврологическая симптоматика. В критерии NANO-LM не входит оценка таких симптомов, как головная боль, пароксизмальная, менингеальная симптоматика. В нашей работе мы дополнительно оценивали выраженность головной боли (0 – нет, 1 – умеренная головная боль, 2 – выраженная головная боль), а также наличие менингеальной симптоматики (0 – нет, 1 – наличие ригидности мышц затылка, 2 – дополнительные симптомы раздражения оболочек: симптомы Кернига, Брудзинского). Пароксизмальную (судорожную) симптоматику не оценивали, так как даже при ее наличии она регрессировала на фоне антиконвульсантной терапии.

Наиболее частыми симптомами были следующие:

1. Головная боль диффузного характера, вызванная непосредственным поражением опухолью мозговых оболочек, определялась у 25 (25/30; 85,0 %) пациенток. В 4 (4/30; 13,0 %) случаев головная боль была связана с арезорбтивной внутренней гидроцефалией.
2. Глазодвигательные нарушения, связанные с поражением III (глазодвигательного) или VI (отводящего) черепных нервов отмечались у 16 (16/30; 53,0 %) пациенток. Поражение VII (лицевого) нерва и связанный с ним парез лицевой мускулатуры зафиксированы у 2 (2/30; 6,0 %) пациенток.
3. Менингеальная симптоматика в виде ригидности мышц затылка и других симптомов натяжения была выявлена у 10 (10/30; 33,3 %) пациенток.
4. Нарушение координации движений в виде атаксии зарегистрировано у 14 (14/30; 47,0 %) пациенток.
5. Поражение оболочек спинного мозга сопровождалось болевым синдромом в конечностях

у 4 (4/30; 13,0 %) пациенток, тазовыми расстройствами (в виде недержания мочи) – у 5 (5/30; 16,6 %) пациенток. Пара- или монопарез имелся у 5 (5/30; 16,6 %) пациенток, но был вызван мета-статическим поражением позвонков.

Балльная оценка неврологического статуса каждой пациентки определялась путем суммирования баллов каждого симптома, который имелся у больной. Пример подсчета баллов неврологической симптоматики у нескольких больных, вошедших в исследование, приведен в табл. 4.

**Таблица 4.** Пример оценки (балл) неврологической симптоматики у больных раком молочной железы

**Table 4.** Example of calculating the score for neurological symptoms in patients with breast cancer

Номер пациентки Patient's number	Оценка неврологической симптоматики Assessment of neurological symptoms	Сумма Total
1	Головная боль – 1 Headache – 1	1
2	Мозжечковая атаксия – 2 Cerebellar ataxia – 2	2
3	Менингеальная симптоматика – 2, недостаточность III черепного нерва – 1 Meningeal symptoms – 2, third cranial nerve insufficiency – 1	3
4	Головная боль – 2, атаксия – 2 Headache – 2, ataxia – 2	4
5	Симптомы синдрома конского хвоста – 2, недостаточность III черепного нерва – 1, каудальной группы нервов – 2 Cauda equina symptoms – 2, third cranial nerve insufficiency – 1, caudal nerve insufficiency – 2	5
6	Менингеальная симптоматика – 2, головная боль – 2, атаксия – 2 Meningeal symptoms – 2, headache – 2, ataxia – 2	6

Анализ взаимосвязи неврологического статуса с опухолевым цитозом до лечения показал, что зависимость между этими показателями отсутствовала ( $r = 0,056$ ;  $p = 0,770$ ): так, при невысоком уровне опухолевого цитоза могла быть выраженная неврологическая симптоматика (75 клеток, оценка симптоматики – 6 баллов) и, наоборот, при повышенном уровне цитоза могли быть легкие неврологические проявления (400 клеток, оценка симптоматики – 3 балла).

Все пациентки получали метотрексат по следующей схеме: 15 мг метотрексата интратекально 2 раза

в неделю в течение 1 мес (8 введений), далее — 15 мг метотрексата интратекально 1 раз в неделю (4 введения), затем — 15 мг 1 раз в месяц до прогрессирования или неприемлемой токсичности. Использовался также вариант лечения 15 мг метотрексата интратекально 1 раз в 2 нед при недостаточном неврологическом и цитологическом ответах после интенсивного курса введений.

Через 1 мес после интратекального введения 15 мг метотрексата улучшение ранее имевшейся неврологической симптоматики отмечалось у 17 (17/30; 56,6 %) пациенток. У 9 (9/17; 52,9 %) отмечалось полное отсутствие опухолевых клеток в ликворе. У 8 (8/17; 47,0 %) пациенток цитоз снизился более чем в 2 раза. Примечательно, что все пациентки (по данным МРТ) имели лептоменингеальное поражение на церебральном уровне, и ведущими симптомами были головная боль, глазодвигательные нарушения, атаксия. Среди них отсутствовали пациентки с поражением на спинальном уровне.

В 5 (5/30; 16,6 %) случаях клеточный цитоз уменьшился, но не более чем в 1,2 раза (не более 20 %), что не отразилось на неврологическом статусе пациенток: он оставался стабильным. В 4 (4/30; 13,3 %) случаях цитоз увеличился более чем в 1,2 раза (или  $\geq 20$  %), что привело к нарастанию имеющихся неврологических симптомов у больных и появлению новых. В 4 (4/30; 13,3 %) случаях цитоз увеличился в 1,1 раза (на 5–10 %), что не отразилось на неврологическом статусе пациенток.

Таким образом, к концу 1-го месяца улучшение неврологического статуса с одновременным снижением количества опухолевых клеток в ликворе отмечено у 17 (17/30; 56,6 %) пациенток. Ухудшение неврологического статуса и увеличение цитоза отмечено у 4 (4/30; 13,3 %) пациенток. Для 9 (9/30; 31,1 %) пациенток колебания количества опухолевых клеток в ликворе были незначительными, и это не отразилось на их неврологическом статусе — он оставался стабильным.

Второй месяц пациентки получали метотрексат 15 мг интратекально 1 раз в неделю. К концу 2-го месяца прогрессирование неврологической симптоматики отмечено у 5 (5/30; 16,6 %) пациенток при увеличении количества опухолевых клеток в ликворе более чем в 1,2 раза (или  $\geq 20$  %). Смерть наступила в 5 (5/30; 16,6 %) случаях, из них причиной смерти лептоменингеальное прогрессирование имелось в 3 (3/30; 10,0 %) случаях, в 1 случае (1/30; 3,3 %) — от прогрессирования экстракраниальных метастазов, и в 1 случае (1/30; 3,3 %) — от соматических осложнений. Отсутствие опухолевых клеток в ликворе сохранялось у 8 (8/30; 26,6 %) пациенток, что отражалось стабильной неврологической симптоматикой или дальнейшим улучшением ранее имеющихся

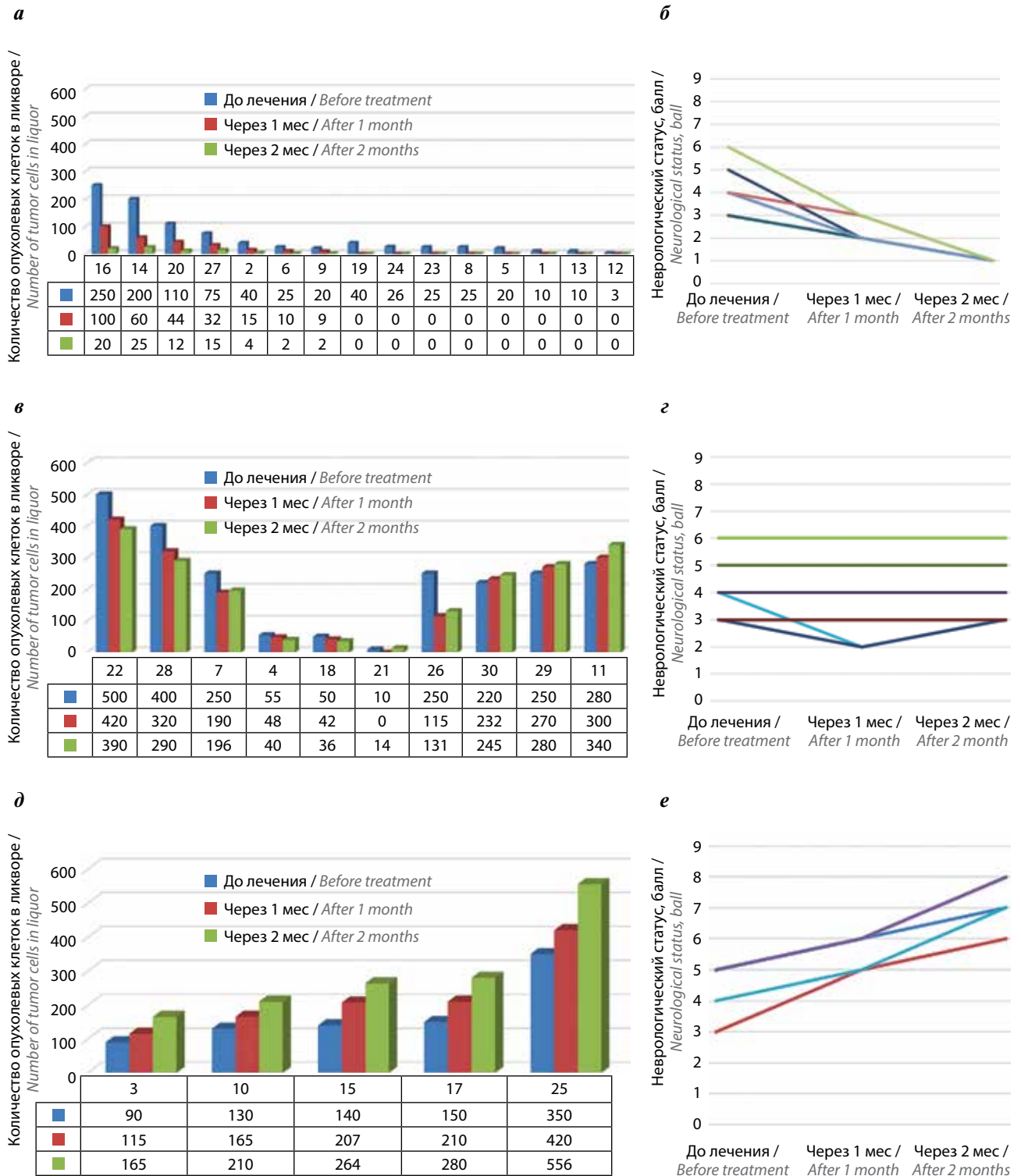
симптомов. У 7 (7/30; 23,3 %) пациенток количество опухолевых клеток в ликворе уменьшилось более чем в 2 раза (или  $\geq 50$  %), что также отражалось улучшением неврологической симптоматики. У 10 пациенток (10/30; 33,3 %) изменения цитоза были незначительными ( $< 1,1$  раза) и не привели к изменению неврологической симптоматики или появлению новых симптомов: у 5 (5/30; 16,6 %) пациенток цитоз снизился и у 5 (5/30; 16,6 %) пациенток — повысился.

Выявлена прямая статистически значимая корреляция количества опухолевых клеток в ликворе и степени выраженности неврологических нарушений — через 1 мес от начала лечения  $r = 0,702$ ;  $p = 0,000$  и через 2 мес —  $r = 0,819$ ;  $p = 0,000$ . Выявлено, что по мере изменения опухолевого цитоза в ликворе менялся и неврологический статус:

- при уменьшении количества опухолевых клеток в ликворе в 2 раза и более (или  $\geq 50$  %) снижалась степень выраженности неврологических нарушений (на 1 балл и более);
- при увеличении количества опухолевых клеток в ликворе в 1,2 раза и более (или  $\geq 20$  %) ухудшался и неврологический статус в виде появления новых симптомов или нарастания имевших место ранее.

Следует отметить, что такая корреляция прослеживалась на всем протяжении лечения (рис. 3). На рис. 3, б приведены данные пациенток, у которых в процессе терапии отмечалось снижение количества опухолевых клеток в ликворе в 2 раза и более, что сопровождалось улучшением неврологического статуса. На рис. 3, г отображены данные пациенток, у которых в процессе терапии отмечалось незначительное снижение или увеличение количества опухолевых клеток в ликворе, не сопровождающееся изменением неврологического статуса. Исключение составляют данные 2 пациенток с разнонаправленной динамикой, у которых уменьшение количества опухолевых клеток в ликворе через 1 мес после лечения сменилось увеличением через 2 мес терапии. На рис. 3, е продемонстрированы данные пациенток, у которых в процессе терапии отмечалось незначительное снижение или увеличение количества опухолевых клеток в ликворе, не сопровождающееся изменением неврологического статуса. Исключение составляют данные 2 пациенток с разнонаправленной динамикой, у которых уменьшение количества опухолевых клеток в ликворе через 1 мес после лечения сменилось увеличением через 2 мес терапии.

Начиная с 3-го месяца те пациентки, которые не имели опухолевого цитоза в ликворе или у которых отмечалось существенное снижение цитоза, получали метотрексат 15 мг интратекально 1 раз в месяц. Пациентки с нарастающим цитозом получали метотрексат 15 мг интратекально 1 раз в 14 дней.



**Рис. 3.** Сравнительная характеристика динамики количества опухолевых клеток в ликворе и неврологического статуса по данным пациентов: 1 – со снижением количества опухолевых клеток в ликворе в 2 раза и более (а) и улучшением неврологического статуса (б); 2 – с увеличением количества опухолевых клеток в ликворе в 1,2 раза и более (в) и ухудшением неврологического статуса (г); 3 – с незначительным снижением или увеличением количества опухолевых клеток в ликворе (д), без изменения неврологического статуса (е)

**Fig. 3.** Comparative characteristics of the dynamics of changes in the number of tumor cells in cerebrospinal fluid and neurological status according to patient data: 1 – with a decrease in the number of tumor cells in cerebrospinal fluid by two times or more (a) and improvement of neurological status (b); 2 – with an increase in the number of tumor cells in cerebrospinal fluid by 1.2 times or more (v) and deterioration of neurological status (g); 3 – with slight decrease or increase in the number of tumor cells in cerebrospinal fluid (d), without change in neurological status (e)

В 20 (20/30; 66,6 %) случаев при наличии экстракраниальных метастазов, помимо интратекального метотрексата, пациентки получали системную химиотерапию в зависимости от рецепторного статуса и молекулярно-генетических особенностей первичной опухоли. В 10 (10/30; 33,3 %) случаев солитарного поражения мозговых оболочек пациентки получали только метотрексат (интратекально). Медиана выживаемости в группе солитарного поражения (только оболочки головного мозга) составила 12,8 мес. В группе пациенток с наличием экстракраниальных метастазов медиана выживаемости составила 8,2 мес, наихудшие показатели отмечались у пациенток с экстракраниальными метастазами более чем на 2 уровнях. Медиана выживаемости во всей группе составила 10,5 мес (min – 1 мес, max – 40 мес). Факторами негативного прогноза являлись:

- 1) трижды негативный или люминальный HER-отрицательный рак;
- 2) короткий период между диагностикой первичной опухоли и лептоменингеальными метастазами;
- 3) более 1 области экстракраниального метастазирования;
- 4) наличие внутримозговых метастазов.

Прогрессирование лептоменингеального поражения, сопровождающееся нарастанием неврологической симптоматики, в 12 (12/30; 40,0 %) случаев привело к смертельному исходу. Уровень опухолевого цитоза в ликворе на момент нарастания неврологической симптоматики во всех случаях менялся в сторону нарастания более чем в 1,2 раза (или  $\geq 20$  %) от уровня цитоза в период стабилизации. В 14 (14/30; 46,6 %) случаев смерть наступила от экстракраниального прогрессирования. Из них в 9 (9/14; 64,3 %) случаев количество опухолевых клеток в ликворе оставалось стабильным, что не приводило к нарастанию неврологической симптоматики. В 5 (5/14; 36,7 %) случаев нарастание цитоза было более чем в 1,2 раза (или  $\geq 20$  %) и сопровождалось нарастанием неврологической симптоматики. У 3 пациенток ухудшение наступило ввиду роста имеющихся и появления новых церебральных метастазов. В 1 случае зарегистрирована смерть от сопутствующей соматической патологии.

Пациенты с лептоменингеальным поражением при солидных опухолях имеют плохой прогноз, и все лечение направлено на стабилизацию неврологического статуса пациентов. При этом интратекальная терапия при солидных опухолях может быть использована только у пациенток с лептоменингеальными метастазами РМЖ (метотрексат, при HER2-положительных опухолях – трастузумаб). В арсенале клинициста необходима методика оценки прогноза динамики неврологической симптоматики в ходе лечения. В мировой литературе мнение о прогностической

роли количественной оценки циркулирующих опухолевых клеток в ликворе противоречивы. С одной стороны, считается, что количественная оценка циркулирующих опухолевых клеток в ликворе не может быть использована в качестве прогностического фактора в связи с особенностями циркуляции ликвора, неравномерным распределением опухолевых клеток в субарахноидальном пространстве [17]. С другой стороны, все больше работ указывают на прогностическую роль количественной оценки [18, 19]. Совершенствуются методики выявления опухолевых клеток в ликворе (цитологическое исследование, использование автоматизированной системы подсчета циркулирующих опухолевых клеток, опухолевых ДНК) [20, 21].

В нашем исследовании мы попытались проследить корреляцию между количественными показателями опухолевого цитоза в ликворе и динамикой неврологического статуса пациентов. Выявлено, что при снижении опухолевого цитоза в ликворе в 2 раза и более, или  $\geq 50$  % от исходного уровня, отмечалось улучшение или регресс неврологической симптоматики. Причем наиболее быстро регрессировали церебральные симптомы, в последнюю очередь – спинальные. Лучший прогноз имели пациентки с исходно низким уровнем опухолевого цитоза, в то же время низкий уровень цитоза до лечения не гарантировал хорошие неврологические показатели до начала терапии. Нарастание неврологической симптоматики отмечалось при росте количества опухолевых клеток в ликворе в 1,2 раза и более (или  $\geq 20$  %). Динамику данных нейровизуализации (МРТ головного мозга с контрастным усилением) не оценивали, поскольку рентгенологические признаки, типичные для лептоменингеального поражения, как правило, малы по объему и сложны по геометрии, современная технология МРТ не позволяет проводить количественную оценку имеющихся изменений на томограмме.

### Заключение

Таким образом, количество опухолевых клеток в ликворе до начала лечения не определяло тяжесть состояния пациенток. При невысоком уровне опухолевого цитоза могла присутствовать выраженная неврологическая симптоматика, и, наоборот, при высоком уровне могли быть легкие неврологические проявления. Тем не менее прослеживалась динамика в процессе лечения пациенток. Клиническая картина менялась в зависимости от показателя опухолевого цитоза:

- улучшение или регресс неврологической симптоматики отмечались при снижении опухолевого цитоза в ликворе в 2 раза и более (или  $\geq 50$  %) от исходного уровня;

- нарастание неврологической симптоматики отмечалось при росте количества опухолевых клеток в ликворе 1,2 раза и более (или  $\geq 20$  %);
- наиболее быстрое и наиболее частое число неврологических и цитологических ответов происходило к концу 1-го месяца интратекального введения метотрексата (15 мг 2 раза в неделю) у 17 (17/30; 56,6 %) пациенток: у 8 (8/17; 47,1 %) отмечалось полное отсутствие опухолевых клеток в ликворе, и у 9 (9/17; 53,9 %) – цитоз снизился более чем в 2 раза.

В первую очередь регрессировали глазодвигательные нарушения, уменьшилась головная боль.

Наибольший рост неврологической симптоматики отмечался к концу 2-го месяца лечения – у 9 (9/30; 30,0 %) больных, у которых рост количества опухолевых клеток в ликворе составил более чем в 1,2 раза, причем это были те пациентки, у которых отмечался нарастающий цитоз после 1-го месяца лечения.

Оценка динамики опухолевого цитоза в ликворе наряду с клинической характеристикой могут быть рекомендованы к использованию в прогнозе ответа на лечение у пациенток с лептоменингеальными метастазами РМЖ.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Le Rhun E., Weller M. EANO-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up of patients with leptomeningeal metastasis from solid tumours. *Annals of Oncology* 2017;28(4):iv84–99. DOI: 10.1093/annonc/mdx221
2. Maass S. Ueber diffuse Karzinomatose der weichen Hirnhäute. *Arch Psychiat Nervenkrankheit* 1903;36:720.
3. Бабчин И.С., Бабчина И.П., Калкун В.Р. Метастатический рак мозга. Л.: Медицина. Ленингр. отд-ние, 1974. 192 с. Babchin I.S., Babchina I.P., Kalkun V.R. Metastatic brain cancer. Leningrad: Medicine. Leningr. publishing house, 1974. 192 p. (In Russ.).
4. Барон М.А., Майорова Н.А. Атлас функциональной стереоморфологии мозговых оболочек. М.: Медицина, 1982. 350 с. Baron M.A., Mayorova N.A. Atlas of functional stereomorphology of the meninges. Moscow: Medicine, 1982. 350 p. (In Russ.).
5. Galicia N., Diez P., Dégano R.M. et al. Proteomic biomarker identification in cerebrospinal fluid for leptomeningeal metastases with neurological complications. *Adv Exp Med Biol* 2017;974:85–96. DOI: 10.1007/978-3-319-52479-5\_5
6. Mack F., Baumert B.G., Schäfer N. et al. Therapy of leptomeningeal metastasis in solid tumors. *Cancer Treat Rev* 2016;43:83–91. DOI: 10.1016/j.ctrv.2015.12.004
7. Le Rhun E., Preusser M., van den Bent M. et al. How we treat patients with leptomeningeal metastases. *ESMO Open* 2019;4(Suppl. 2):e000507. DOI: 10.1136/esmoopen-2019-000507
8. Abouharb S., Ensor J., Loghin M.E. Leptomeningeal disease and breast cancer: the importance of tumor subtype. *Breast Cancer Res Treat* 2014;146(3):477–86. DOI: 10.1007/s10549-014-3054-z
9. Grossman S.A., Krabak M.J. Leptomeningeal carcinomatosis. *Cancer Treat Rev* 1999;25(2):103–19. DOI: 10.1053/ctrv.1999.0119
10. Groves M.D. Leptomeningeal disease. *Neurosurg Clin N Am* 2011;22(1):67–78. DOI: 10.1016/j.nec.2010.08.006
11. Grossman S.A., Finkelstein D.M., Ruckdeschel J.C. Randomised prospective comparison of intraventricular methotrexate and thiotepa in patients with previously untreated neoplastic meningitis. *J Clin Oncol* 1993;11(3):561–9. DOI: 10.1200/JCO.1993.11.3.561
12. Palmisciano P., Watanabe G. Intrathecal therapy for the management of leptomeningeal metastatic disease: a scoping review of the current literature and ongoing clinical trials. *J Neurooncol* 2022;160(1):79–100. DOI: 10.1007/s11060-022-04118-0
13. Mack F., Baumert B.G., Schäfer N. et al. Therapy of leptomeningeal metastasis in solid tumors. *Cancer Treat Rev* 2016;43:83–91. DOI: 10.1016/j.ctrv.2015.12.004
14. Nayak L., DeAngelis L.M. The Neurologic Assessment in Neuro-Oncology (NANO) scale: a tool to assess neurologic function for integration into the Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) criteria. *Neuro Oncol* 2017;19(5):625–35. DOI: 10.1093/neuonc/nox029
15. Chukwueke U.N., Wen P.Y. Use of the Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) criteria in clinical trials and clinical practice. *CNS Oncol* 2019;1;8(1):CNS28. DOI: 10.2217/cns-2018-0007
16. Drappatz J., Batchelor T.T. Leptomeningeal neoplasms. *Curr Treat Options Neurol* 2007;9(4):283–93. DOI: 10.1007/s11940-007-0014-5
17. Le Rhun E., Nayak L. NANO-LM: An updated scorecard for the clinical assessment of patients with leptomeningeal metastases. *Neuro Oncol* 2025;27(2):455–65. DOI: 10.1093/neuonc/noae171
18. Malani R., Fleisher M., Kumthekar P. Cerebrospinal fluid circulating tumor cells as a quantifiable measurement of leptomeningeal metastases in patients with HER2 positive cancer. *Clinical Trial J Neurooncol* 2020;148(3):599–606. DOI: 10.1007/s11060-020-03555-z
19. Barbour A.B., Blow B., Taylor L.P. et al. Prognostic value of cerebrospinal fluid tumor cell counts in leptomeningeal lesions caused by solid tumors. *J Neurooncol* 2024;167:509–14. DOI: 10.1007/s11060-024-04615-4
20. Diaz M., Singh P., Kotchetkov I.S. Quantitative assessment of circulating tumor cells in cerebrospinal fluid as a clinical tool to predict survival in leptomeningeal metastases. *J Neurooncol* 2022;157(1):81–90. DOI: 10.1007/s11060-022-03949-1
21. Olayode O.O., Ogunoye B.T., Oladeji E.O. Cerebrospinal fluid circulating tumor DNA (ctDNA) as a biomarker for CNS metastases in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): a systematic review and meta-analysis comparing CSF ctDNA and traditional methods. *BMC Cancer* 2025;25(1):1246. DOI: 10.1186/s12885-025-14583-1

**Вклад авторов**

Д.М. Белов: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, подготовка заключений по результатам исследований;

А.Х. Бекяшев, Д.Р. Насхлеташвили, В.А. Алешин: разработка дизайна исследования, подготовка заключений по результатам исследований;

Е.А. Москвина, А.А. Митрофанов, Е.В. Прозоренко, Р.А. Суфианов: получение клинических данных для анализа;

А.А. Борунова, Т.Н. Заботина: разработка дизайна исследования, анализ статистических данных, подготовка заключений по результатам исследований;

М.М. Хатукаева: получение цитологических данных для исследования.

**Author's contributions**

D.M. Belov: study design development, data acquisition, data analysis, and preparation of conclusions based on the study results;

A.Kh. Bekyashev, D.R. Naskhletashvili, V.A. Aleshin: study design development, and preparation of conclusions based on the study results;

E.A. Moskvina, A.A. Mitrofanov, E.V. Prozorenko, R.A. Sufianov: clinical data acquisition;

A.A. Borunova, T.N. Zabolina: study design development, statistical data analysis and preparation of conclusions based on the study results;

M.M. Khatukaeva: cytological data acquisition.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

Д.М. Белов / D.M. Belov: <https://orcid.org/0000-0003-1766-0032>

А.Х. Бекяшев / A.Kh. Bekyashev: <https://orcid.org/0000-0002-4160-9598>

Е.А. Москвина / E.A. Moskvina: <https://orcid.org/0000-0001-5242-9309>

Д.Р. Насхлеташвили / D.R. Naskhletashvili: <https://orcid.org/0000-0002-4218-9652>

А.А. Борунова / A.A. Borunova: <https://orcid.org/0000-0002-1854-3455>

В.А. Алешин / V.A. Aleshin: <https://orcid.org/0000-0003-1389-9038>

А.А. Митрофанов / A.A. Mitrofanov: <https://orcid.org/0000-0002-4125-7342>

Е.В. Прозоренко / E.V. Prozorenko: <https://orcid.org/0000-0001-8880-1758>

М.М. Хатукаева / M.M. Khatukaeva: <https://orcid.org/0009-0002-7517-4358>

Р.А. Суфианов / R.A. Sufianov: <https://orcid.org/0000-0003-4031-0540>

Т.Н. Заботина / T.N. Zabolina: <https://orcid.org/0000-0001-7631-5699>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках НИОКТР (регистрационный номер 123021600103-5 NUYO-2023-0021).

**Funding.** The work was carried out within the framework of research and development (registration number 123021600103-5 NUYO-2023-0021).

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики.** Пациенты подписали форму добровольного информированного согласия на публикацию медицинской информации.

**Compliance with patient rights and principles of bioethics.** Written consent was obtained from the patients for publication of relevant medical information.

Статья поступила: 06.06.2025. Принята к публикации: 15.10.2025. Опубликовано онлайн: 10.12.2025.

Article submitted: 06.06.2025. Accepted for publication: 15.10.2025. Published online: 10.12.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-31-38>

# Значение уровня эксцизионных колец Т-клеточных рецепторов и к-делеционного элемента рецептора В-клеток в эффективности терапии метастатического рака яичников

А.В. Султанбаев<sup>1-3</sup>, И.А. Тузанкина<sup>3,4</sup>, К.В. Меньшиков<sup>1,2</sup>, А.Ф. Насретдинов<sup>1</sup>, Н.И. Султанбаева<sup>1</sup>, Ш.И. Мусин<sup>1</sup>, А.А. Измайлов<sup>1,2</sup>, М.В. Султанбаев<sup>2</sup>, А.А. Измайлова<sup>5</sup>, Е.А. Трошенков<sup>5</sup>, Д.А. Кудлай<sup>2, 6, 7</sup>

<sup>1</sup>ГАОУ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Минздрава Республики Башкортостан; Россия, 450054 Уфа, пр-кт Октября, 73/1;

<sup>2</sup>ФГБОУ «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 450008 Уфа, ул. Ленина, 3;

<sup>3</sup>ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН»; Россия, 620078 Екатеринбург, ул. Первомайская, 106;

<sup>4</sup>ГАОУ Свердловской области «Областная детская клиническая больница»; Россия, 620085 Екатеринбург, ул. Серафимы Дерябиной, 32;

<sup>5</sup>Московский научный исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 119121 Москва, ул. Погодинская, 6, стр. 1;

<sup>6</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119048 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

<sup>7</sup>ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

**Контакты:** Александр Валерьевич Султанбаев [rkodrb@yandex.ru](mailto:rkodrb@yandex.ru)

**Введение.** В формировании специфического противоопухолевого иммунитета важная роль отводится экспрессии лигандов запрограммированной клеточной гибели-1, антигенной нагрузке и рецепторам иммунокомпетентных клеток. Маркером разнообразия рецепторов иммунокомпетентных клеток к различным антигенам являются эксцизионные кольца к-делеционного элемента В-клеток (KREC) и Т-клеточного рецептора (TREC), которые представляют собой внехромосомные структуры ДНК.

**Цель исследования** – оценка влияния уровней TREC и KREC на эффективность терапии олапарибом больных генерализованным раком яичников.

**Материалы и методы.** В исследование включены 40 пациенток, находящихся на лечении в Республиканском клиническом онкологическом диспансере (РКОД) Минздрава Республики Башкортостан по поводу рака яичников. Локальным этическим комитетом РКОД 21 июля 2022 г. утвержден протокол «ИО-001» одноцентрового нерандомизированного открытого клинического исследования «Определение TREC и KREC у пациенток со злокачественными новообразованиями различных локализаций». Всем пациенткам была назначена терапия олапарибом (международное непатентованное наименование). Средний возраст пациенток составил 57,92 года (от 27 лет до 81 года). Для определения мутаций в генах, связанных с HRD (дефицитом гомологичной рекомбинации), применяли секвенирование следующего поколения путем аллель-специфической полимеразной цепной реакции. До начала терапии проводили оценку уровня TREC и KREC всех пациенток.

**Результаты.** До начала терапии в общей популяции медиана TREC составила 9,6 копии/10<sup>5</sup> клеток, медиана KREC – 183,8 копий/10<sup>5</sup> клеток. Минимальный и максимальный уровни TREC составили 0,07 копии/10<sup>5</sup> клеток и 215 копий/10<sup>5</sup> клеток соответственно. Минимальный и максимальный уровни KREC составили 2,8 копии/10<sup>5</sup> клеток и 1559,42 копии/10<sup>5</sup> клеток соответственно. В группе пациенток с прогрессированием заболевания наблюдали низкий уровень TREC. По результатам исследования прогрессирование заболевания прогнозировалось при значении TREC <13,23 копии/10<sup>5</sup> клеток. Полученные результаты указывают на статистически значимый низкий уровень KREC до начала лечения у пациенток, прогрессирующих на фоне терапии олапарибом.

**Заключение.** Определена прогностическая роль TREC и KREC. Выявлены пороговые уровни TREC (13,23 копии/10<sup>5</sup> клеток) и KREC (251,04 копии/10<sup>5</sup> клеток), ниже которых наблюдалось прогрессирование заболевания. Дальнейшее исследование позволит учитывать динамику изменения уровней TREC и KREC, а также использовать прогностическое значение этих параметров в лечении рака яичников.

**Ключевые слова:** рак яичников, TREC, KREC, противоопухолевый иммунитет, дефицит гомологичной рекомбинации

**Для цитирования:** Султанбаев А.В., Тузанкина И.А., Меньшиков К.В. и др. Значение уровня эксцизионных колец T-клеточных рецепторов и κ-делеционного элемента рецептора B-клеток в эффективности терапии метастатического рака яичников. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(4):31–8.  
DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-31-38>

## The importance of the level of T-cell receptor excision circles and κ-deletion B-cell receptor excision circles in the effectiveness of therapy for metastatic ovarian cancer

Alexander V. Sultanbaev<sup>1–3</sup>, Irina A. Tuzankina<sup>3,4</sup>, Konstantin V. Menshikov<sup>1,2</sup>, Ainur F. Nasretdinov<sup>1</sup>, Nadezhda I. Sultanbaeva<sup>1</sup>, Shamil I. Musin<sup>1</sup>, Adel A. Izmailov<sup>1,2</sup>, Mikhail V. Sultanbaev<sup>2</sup>, Angelina A. Izmailova<sup>5</sup>, Evgeniy A. Troshenkov<sup>5</sup>, Dmitry A. Kudlay<sup>2,6,7</sup>

<sup>1</sup>Republican Clinical Oncology Dispensary, Ministry of Health of the Republic of Bashkortostan; 73/1 Oktyabrya Avenue, 450054, Ufa, Russia;

<sup>2</sup>Bashkir State Medical University, Ministry of Health of Russia; 3 Lenina St., 450008 Ufa, Russia;

<sup>3</sup>Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; 106 Pervomaiskaya St., 620078 Ekaterinburg, Russia;

<sup>4</sup>Sverdlovsk Region Regional Children's Clinical Hospital; 32 Serafima Deryabina St., 620085 Ekaterinburg, Russia;

<sup>5</sup>P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; build. 1, 6 Pogodinskaya St., 119121 Moscow, Russia;

<sup>6</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenovskiy University); build. 2, 8 Trubetskaya St., 119048 Moscow, Russia;

<sup>7</sup>State Scientific Center “Institute of Immunology”; 24 Kashirskoe Shosse, 115522 Moscow, Russia

**Contacts:** Alexander Valerievich Sultanbaev [rkodrb@yandex.ru](mailto:rkodrb@yandex.ru)

**Background.** Antigen load, expression of programmed cell death ligand 1 and T-cell receptors play a key role in the formation of specific antitumor immunity. The marker of the diversity of the repertoire of receptors of immunocompetent cells to various antigens are T-cell receptor excision circles (TREC) and the κ-deletion B-cell receptor excision circles (KREC), which are extrachromosomal DNA structures.

**Aim.** To evaluate the effect of the diversity of TREC and KREC on the effectiveness of olaparib therapy for generalized ovarian cancer.

**Materials and methods.** The study included 40 patients undergoing treatment at the Republican Clinical Oncological Dispensary (RCOD) of the Ministry of Health of the Republic of Bashkortostan for ovarian cancer. The local ethics committee of RCOD approved on July 21, 2022 the protocol “IO-001” of a single-center non-randomized open clinical trial entitled “Determination of TREC and KREC in patients with malignant neoplasms of various localizations”. All patients were prescribed olaparib therapy (international non-proprietary name). To identify mutations in genes associated with HRD (homologous recombination deficiency), next-generation sequencing by allele-specific polymerase chain reaction was used. Before the start of therapy, the level of TREC and KREC was assessed.

**Results.** Before the start of therapy in the general population, the median TREC was 9.6 copies/10<sup>5</sup> cells, the median KREC was 183.8 copies/10<sup>5</sup> cells. The minimum and maximum TREC levels were 0.07 copies/10<sup>5</sup> cells and 215 copies/10<sup>5</sup> cells, respectively. The minimum and maximum KREC levels were 2.8 copies/10<sup>5</sup> cells and 1559.42 copies/10<sup>5</sup> cells, respectively. In the group of patients with disease progression, the level of TREC was low. According to the results of the study, disease progression was predicted at a TREC value <13.23 copies/10<sup>5</sup> cells. The obtained results indicate a significantly low level of KREC before the start of therapy in patients who progressed during therapy.

**Conclusion.** The prognostic role of TREC and KREC has been determined. Further research will allow us to take into account changes in TREC and KREC indicators in dynamics and use the prognostic value of these changes in the treatment of ovarian cancer. Threshold levels of TREC (13.23 copies/10<sup>5</sup> cells) and KREC (251.04 copies/10<sup>5</sup> cells) were detected, below which disease progression was observed.

**Keywords:** ovarian cancer, T-cell receptor excision circles, κ-deletion B-cell receptor excision circles, antitumor immunity, homologous recombination deficiency

**For citation:** Sultanbaev A.V., Tuzankina I.A., Menshikov K.V. et al. The importance of the level of T-cell receptor excision circles and κ-deletion B-cell receptor excision circles in the effectiveness of therapy for metastatic ovarian cancer. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(4):31–8. (In Russ.).  
DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-31-38>

## Введение

В последние годы подходы к лечению наследственных форм рака яичников (РЯ) кардинально поменялись, что связано с открытием генов *BRCA1* (breast cancer associated gene) и *BRCA2*. У носителей герминальных мутаций в генах *BRCA* наблюдается повышенный риск развития не только РЯ, но и злокачественных новообразований других локализаций. Известно, что примерно 20–30 % случаев РЯ связаны с герминальными и соматическими мутациями в генах репарации [1–3].

В канцерогенезе РЯ, кроме мутационной трансформации, важная роль отводится иммунному надзору над опухолью. При этом генетическая нестабильность раковых клеток способствует их неконтролируемой пролиферации и экспрессии неоантигенов, которые распознаются иммунной системой [4].

Вероятность формирования специфического противоопухолевого иммунитета определяется разнообразием неоантигенов, которое зависит от мутационной нагрузки (tumor mutational burden, ТМВ) [5, 6]. Хорошо известно, что ТМВ предсказывает ответ на иммунотерапию при солидных новообразованиях, что описано как в доклинических, так и в клинических исследованиях [7–14]. При этом РЯ считается опухолью с низким уровнем мутационной нагрузки [15, 16]. Для РЯ медиана ТМВ составляет 3,6 мутации/Мб, а средняя мутационная нагрузка – 5,3 мутации/Мб [17].

Несмотря на высокую долю HRD (homologous recombination deficiency – дефицит гомологичной рекомбинации) положительного рака яичников, повышенную инфильтрацию Т-лимфоцитами (CD8<sup>+</sup> TILs) и высокую экспрессию опухолевых антигенов, попытки применения многих препаратов контроля иммунных точек остаются неэффективными [18–21]. Однако при этом отмечается, что сочетание иммунотерапии с таргетными препаратами способствует усилению формирования специфического противоопухолевого иммунитета. Ряд авторов также указывают на то, что ингибиторы поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) усиливают вероятность формирования специфического противоопухолевого иммунитета [22, 23]. В клиническом исследовании TOPACIO/KEYNOTE-162 PARP-ингибитор нирапариб продемонстрировал эффективность в сочетании с пембролизумабом при платинорезистентном РЯ [24].

Фактор роста эндотелия сосудов в развитии РЯ играет важную роль в генерализации опухоли. Кроме того, известно, что фактор роста эндотелия сосудов также ингибирует дендритные клетки и инфильтрирующие опухоль лимфоциты [25], которые играют ключевую роль в формировании специфического противоопухолевого иммунитета. Так, в клиническом

исследовании II фазы комбинация бевацизумаба с пембролизумабом продемонстрировала эффективность при РЯ [26, 27]. Улучшение объективного ответа также отмечено в лечении платинорезистентного РЯ при назначении комбинации пембролизумаба с пегилированным липосомальным доксорубицином [28, 29].

Оценка уровня экспрессии лигандов запрограммированной клеточной гибели-1 выполняется при многих злокачественных новообразованиях, тем не менее А. Pawłowska и соавт. отмечают, что пороговое значение для РЯ не определено и требует дальнейшего исследования [30].

Роль иммунной системы в надзоре за злокачественными клетками при РЯ известна уже много лет. Необходимо отметить, что, кроме ТМВ и антигенной нагрузки, важная роль в формировании специфического противоопухолевого иммунитета отводится Т-клеточным рецепторам. Маркерами разнообразия рецепторов иммунокомпетентных клеток к антигенам являются эксцизионные кольца Т-клеточного рецептора (T-cell receptor excision circles, TREC) и κ-делеционного элемента В-клеток (κ-deletion B-cell receptor excision circles, KREC), которые относятся к внехромосомным структурам ДНК [31].

**Цель исследования** – оценка влияния уровней TREC и KREC на эффективность терапии олапарибом больных генерализованным раком яичников.

## Материалы и методы

Локальным этическим комитетом Республиканского клинического онкологического диспансера Минздрава Республики Башкортостан 21 июля 2022 г. было одобрено одноцентровое нерандомизированное открытое клиническое исследование «Определение TREC и KREC у пациентов со злокачественными новообразованиями различных локализаций».

В исследование включили 40 женщин, средний возраст которых составил 57,9 года (от 27 лет до 81 года). Пациенткам по поводу РЯ и фаллопиевых труб назначали олапариб (международное непатентованное наименование). У вошедших в исследование пациенток в анамнезе отсутствовали острые и хронические воспалительные заболевания. У всех пациенток мутации в генах репарации HRD определяли в венозной крови и ткани опухоли. Молекулярно-генетическое исследование проводили с помощью аллель-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на аппарате Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), что позволило обнаружить как соматические, так и герминальные мутации. В исследовании применяли диагностическую панель, которая позволяет определить мутации, обнаруживаемые с высокой частотой в генах *BRCA1* (3819delGTA, 4153delA, 5382insC, 300T>G, 2080delA,

185delAG) и BRCA2 (6174delT). При получении отрицательных результатов после исследования методом ПЦР биоматериалы использовали для проведения исследования методом секвенирования следующего поколения. Забор венозной крови в вакуумную пробирку осуществляли однократно до начала терапии олапарибом, а также проводили оценку общего и биохимического анализов крови, коагулограммы.

При определении уровней TREC и KREC для выделения ДНК из клинического материала использовали реагенты «РИБО-преп» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия), для ПЦР – набор реагентов «ИММУНО-БИТ («АБВ-тест», Россия). Для исследования применяли амплификатор Real-time CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, США) и детектирующий амплификатор ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия).

По возрасту когорты вошедших в исследование пациенток распределилась следующим образом: от 25 до 44 лет – 7 (17,5 %), от 45 до 60 лет – 12 (30 %), старше 60 лет – 21 (52,5 %).

Статистический анализ проводили с помощью специализированной программы StatTech v.4.6.1 («Статтех», Россия). Полученные данные считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты

Анализ выполнен среди 40 пациенток с метастатическим РЯ. До начала терапии в общей популяции медиана TREC составила 9,6 копии/ $10^5$  клеток [межквартильный интервал 1-го и 3-го квартилей –  $Q_1-Q_3$ : 3,25–51,77], медиана уровня KREC составила 183,8 копии/ $10^5$  клеток [ $Q_1-Q_3$ : 89,85–352,97]. Минимальное и максимальное значения TREC составили 0,07 копии/ $10^5$  клеток и 215,0 копии/ $10^5$  клеток соответственно. Минимальное и максимальное значения KREC составили 2,8 копии/ $10^5$  клеток и 1559,42 копии/ $10^5$  клеток соответственно.

Все 40 пациенток имели платиночувствительный BRCA-ассоциированный РЯ. Каждой пациентке в 1-й линии лечения проведено 6 курсов внутривенной

химиотерапии по схеме паклитаксел в дозе 175 мг/ $m^2$  в комбинации с препаратом карбоплатин в дозе, рассчитанной как AUC 6 (площадь под кривой «концентрация – время»), каждые 3 нед. В последующем, после достижения объективного ответа на химиотерапию, назначали поддерживающую терапию олапарибом, лечение проводили до появления признаков прогрессирования заболевания. Динамику заболевания оценивали по данным компьютерной томографии.

Нами выполнен анализ уровня TREC в группах пациентов с прогрессированием заболевания и без такового (табл. 1).

По результатам исследования у пациентов с низким уровнем TREC наблюдали высокую частоту прогрессирования заболевания.

Для определения риска рецидива в зависимости от уровня TREC проведена оценка вероятности с помощью ROC-анализа (receiver operating characteristic). Площадь ROC-кривой –  $0,945 \pm 0,044$  (95 % доверительный интервал 0,858–1,000). Полученная модель была статистически значимой ( $p < 0,001$ ).

Значение TREC в точке cut-off (наивысшее значение индекса Юдена) – 13,23 копии/ $10^5$  клеток. При уровне TREC ниже данного прогнозируется прогрессирование РЯ. Чувствительность и специфичность модели составили 84,6 и 92,9 % соответственно.

При оценке динамики заболевания у 4 (10 %) пациенток констатировали прогрессирование, полный ответ (ПО) – у 15 (37,5 %), частичный ответ (ЧО) – у 11 (27,5 %), стабилизацию – у 10 (25 %) женщин. На фоне терапии олапарибом частота объективного ответа составила 65 %: ПО (37,5 %) + ЧО (27,5 %). Частота клинического эффекта равна 90 %: ПО (37,5 %) + ЧО (27,5 %) + стабилизация заболевания (25 %).

Для определения зависимости объективного ответа от разнообразия T-клеточных рецепторов при терапии олапарибом нами выполнен анализ уровня TREC в зависимости от характера ответа по RECIST1.1 (Response evaluation criteria in solid tumors – критерии оценки ответа солидных опухолей [на лечение]) (табл. 2).

**Таблица 1.** Уровень эксцизионных колец T-клеточного рецептора (TREC) у пациенток с прогрессированием рака яичников и без такового  
Table 1. T-cell receptor excision circle (TREC) levels in patients with ovarian cancer with and without disease progression

Течение заболевания Disease course	TREC (копии/ $10^5$ клеток) TREC (copies/ $10^5$ cells)		p
	Медиана Median	$Q_1-Q_3$	
Нет прогрессирования (n = 14) Non-progression (n = 14)	70,58	42,39–129,32	<0,001
Прогрессирование (n = 26) Progression (n = 26)	5,14	0,91–9,75	

**Таблица 2.** Уровень эксцизионных колец T-клеточного рецептора (TREC) в зависимости от характера ответа на терапию**Table 2.** T-cell receptor excision circle (TREC) levels according to the type of response to therapy

Ответ на терапию Response level	TREC (копии/10 <sup>5</sup> клеток) TREC (copies/10 <sup>5</sup> cells)		p
	Медиана Median	Q <sub>1</sub> –Q <sub>3</sub>	
ПО (n = 15) CR (n = 15)	71,87	44,18–125,71	$p_{\text{ЧО-ПО}} = 0,008$ $p_{\text{стаб.-ПО}} < 0,001$ $p_{\text{прог.-ПО}} < 0,001$ $p_{\text{PR-CR}} = 0,008$ $p_{\text{stab.-CR}} < 0,001$ $p_{\text{prog.-CR}} < 0,001$
ЧО (n = 11) PR (n = 11)	8,25	5,77–11,07	
Стабилизация (n = 10) Stable (n = 10)	0,89	0,49–5,41	
Прогрессирование (n = 4) Progression (n = 4)	0,95	0,78–1,17	

**Примечание.** ЧО – частичный ответ; ПО – полный ответ; прог. – прогрессирование; стаб. – стабилизация.  
**Note.** PR (partial response) – частичный ответ; CR (complete response) – полный ответ; prog. – progression; stab. – stable.

**Таблица 3.** Уровень κ-делеционного элемента В-клеток (KREC) у пациенток с прогрессированием рака яичников и без такового**Table 3.** κ-Deletion B-cell receptor excision circles (KREC) levels in patients with ovarian cancer with and without disease progression

Течение заболевания Disease course	KREC (копии/10 <sup>5</sup> клеток) KREC (copies/10 <sup>5</sup> cells)		p
	Медиана Median	Q <sub>1</sub> –Q <sub>3</sub>	
Нет прогрессирования (n = 14) Non-progression (n = 14)	305,96	186,69–647,50	0,019
Прогрессирование (n = 26) Progression (n = 26)	129,88	74,43–235,57	

В ходе исследования нами отмечено, что у пациентов с ПО статистически значимо выше медиана уровня TREC, чем у пациентов с ЧО или со стабилизацией и прогрессированием заболевания. Полученные результаты подтверждают роль иммунной системы в надзоре за злокачественными клетками при терапии олапарибом.

Нами также проведен анализ уровня KREC в группах пациенток с прогрессированием РЯ и без такового (табл. 3).

В группе с прогрессированием в сравнении с пациентками без такового уровень KREC статистически значимо ниже ( $p = 0,019$ ), что является суррогатным маркером отрицательной динамики.

При анализе вероятности прогрессирования в зависимости от уровня KREC определена площадь ROC-кривой, которая составила  $0,728 \pm 0,088$  (95 % доверительный интервал 0,555–0,901). Представленная модель оказалась статистически значимой ( $p = 0,019$ ).

Значение KREC в точке cut-off (наивысшее значение индекса Юдена) – 251,04 копии/10<sup>5</sup> клеток.

В группе с KREC ниже данного уровня риск прогрессирования РЯ выше. Чувствительность и специфичность модели – соответственно 80,8 и 64,3 %.

При оценке уровня KREC в зависимости от характера ответа на терапию у женщин с генерализованным РЯ выявлены статистически значимые различия (табл. 4).

В зависимости от характера ответа на терапию у женщин с распространенным РЯ определяются статистически значимые различия ( $p = 0,02$ ) уровня KREC, что отражает дефицит со стороны В-клеточного иммунитета у пациентов с худшим ответом.

### Обсуждение

У пациентов с распространенным РЯ отмечено прогрессирование заболевания при низком уровне TREC и KREC при терапии олапарибом.

Следует отметить, что геномная нестабильность усложняет формирование противоопухолевого иммунитета. Применение противоопухолевых лекарственных препаратов часто не позволяет добиться

**Таблица 4.** Уровень κ-делеционного элемента В-клеток (KREC) в зависимости от максимального ответа у женщин с генерализованным раком яичников

**Table 4.** κ-Deletion B-cell receptor excision circles (KREC) levels according to the best overall response in women with advanced ovarian cancer

Максимальный ответ Response level	KREC, копии/10 <sup>5</sup> клеток KREC (copies/10 <sup>5</sup> cells)		p
	Медиана Median	Q <sub>1</sub> –Q <sub>3</sub>	
Полный ответ (n = 15) Complete response (n = 15)	300,53	178,62–767,67	0,02
Частичный ответ (n = 11) Partial response (n = 11)	244,44	94,82–510,05	
Стабилизация (n = 10) Stable (n = 10)	136,04	74,43–178,96	
Прогрессирование (n = 4) Progression (n = 4)	93,44	71,80–102,31	

длительного контроля над опухолью, что обусловлено неоднородностью и геномной нестабильностью злокачественных новообразований. При применении PARP-ингибиторов у пациентов с HRD-мутациями прогрессирование заболевания обусловлено формированием резистентного клона клеток, когда важная роль отводится иммунному надзору над опухолью, эффективность которого определяется разнообразием репертуара Т-клеточных рецепторов. В формировании противоопухолевого иммунитета важная роль также отводится развитию антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности, что представляет собой механизм клеточно-опосредованной иммунной защиты, при котором с неоантигенами связываются специфические антитела. При этом вероятность формирования специфического клеточного и гуморального иммунитета зависит соответственно от разнообразия Т- и В-клеточных рецепторов, маркерами которых являются уровни TREC и KREC.

При формировании специфического противоопухолевого иммунитета у больных РЯ назначение препаратов ингибиторов контрольных точек иммунитета позволяет снять блокаду с иммунной системы [22–24], что способствует улучшению контроля над заболеванием. К тому же назначение PARP-ингибиторов в сочетании с иммунотерапией является ключом к успешным клиническим исходам, что показало обнадеживающие результаты [31, 32].

В настоящей работе представлены уровни TREC и KREC у больных с генерализованным РЯ. Дальнейшие исследования уровней TREC и KREC позволят использовать прогностическое значение этих параметров в практической онкологии.

Для эффективного лечения РЯ с драйверными мутациями необходимо более глубокое понимание

взаимоотношений между опухолью и иммунной системой организма в целом [24]. Представленные результаты исследования значительно улучшают понимание о состоянии иммунной системы и его влияние на эффективность различных схем противоопухолевой лекарственной терапии.

Полученные результаты исследования демонстрируют возможность применения оценки уровня TREC и KREC, что позволяет определить риски прогрессии злокачественных новообразований. Определена связь между концентрациями TREC и KREC с клиническими исходами, что говорит о роли клеточного и гуморального иммунодефицита в прогнозе заболевания у больных распространенным РЯ. Установление пороговых значений TREC, ниже которых значительно возрастает риск прогрессирования и смерти, может стать основой для выбора персонализированного подхода к терапии. Использование маркеров, таких как TREC и KREC, в качестве прогностических индикаторов представляет собой многообещающий подход, который может помочь в выборе пациентов для более агрессивного лечения.

### Заключение

В работе представлены результаты исследования уровня TREC и KREC у больных с генерализованным РЯ. Выявлены пороговые уровни TREC (13,23 копии/10<sup>5</sup> клеток) и KREC (251,04 копии/10<sup>5</sup> клеток), ниже которых наблюдается прогрессирование заболевания. Представлена прогностическая значимость уровней TREC и KREC. Полученные результаты демонстрируют возможность использования TREC и KREC как маркеров, влияющих на результаты лечения и показатели выживаемости пациенток.

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

- Sambasivan S. Epithelial ovarian cancer: review article. *Cancer Treat Res Commun* 2022;33:100629. DOI: 10.1016/j.ctarc.2022.100629
- Ripperger T., Gadzicki D., Meindl A., Schlegelberger B. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. *Eur J Hum Genet* 2009;17(6):722–31. DOI: 10.1038/ejhg.2008.212
- Соколенко А.П., Иевлева А.Г., Митюшкина Н.В. и др. Синдром наследственного рака молочной железы и яичников в России. *Acta Naturae* 2010;2(2):31–5. Sokolenko A.P., Iyevleva A.G., Mitiushkina N.V. et al. Hereditary breast-ovarian cancer syndrome in Russia. *Acta Naturae* 2010;2(2):31–5.
- Seidel J.A., Otsuka A., Kabashima K. Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: mechanisms of action, efficacy, and limitations. *Front Oncol* 2018;8:86. DOI: 10.3389/fonc.2018.00086
- Keenan T.E., Burke K.P., Van Allen E.M. Genomic correlates of response to immune checkpoint blockade. *Nat Med* 2019;25(3):389–402. DOI: 10.1038/s41591-019-0382-x
- Meléndez B., Van Campenhout C., Rorive S. et al. Methods of measurement for tumor mutational burden in tumor tissue. *Transl Lung Cancer Res* 2018;7(6):661–7. DOI: 10.21037/tlcr.2018.08.02
- Choucair K., Morand S., Stanbery L. et al. TMB: a promising immune-response biomarker, and potential spearhead in advancing targeted therapy trials. *Cancer Gene Ther* 2020;27(12):841–53. DOI: 10.1038/s41417-020-0174-y
- Yarchoan M., Hopkins A., Jaffee E.M. Tumor mutational burden and response rate to PD-1 inhibition. *N Engl J Med* 2017;377(25):2500–1. DOI: 10.1056/NEJMc1713444
- Yarchoan M., Albacker L.A., Hopkins A.C. et al. PD-L1 expression and tumor mutational burden are independent biomarkers in most cancers. *JCI Insight* 2019;4(6):e126908. DOI: 10.1172/jci.insight.126908
- Hellmann M.D., Callahan M.K., Awad M.M. et al. Tumor mutational burden and efficacy of nivolumab monotherapy and in combination with ipilimumab in small-cell lung cancer. *Cancer Cell* 2018;33(5):853–61.e4. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.04.001
- Hellmann M.D., Nathanson T., Rizvi H. et al. Genomic features of response to combination immunotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Cell* 2018;33(5):843–52.e4. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.03.018
- Rizvi H., Sanchez-Vega F., La K. et al. Molecular determinants of response to anti-programmed cell death (PD)-1 and anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1) blockade in patients with non-small-cell lung cancer profiled with targeted next-generation sequencing. *J Clin Oncol* 2018;36(7):633–41. DOI: 10.1200/JCO.2017.75.3384
- Rizvi N.A., Hellmann M.D., Snyder A. et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015;348(6230):124–8. DOI: 10.1126/science.aaa1348
- Fan S., Gao X., Qin Q. et al. Association between tumor mutation burden and immune infiltration in ovarian cancer. *Int Immunopharmacol* 2020;89(Pt A):107126. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.107126
- Cristescu R., Mogg R., Ayers M. et al. Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy. *Science* 2018;362(6411):eaar3593. DOI: 10.1126/science.aar3593
- Park J., Lee J.Y., Kim S. How to use immune checkpoint inhibitor in ovarian cancer? *J Gynecol Oncol* 2019;30(5):e105. DOI: 10.3802/jgo.2019.30.e105
- Morse C.B., Elvin J.A., Gay L.M., Liao J.B. Elevated tumor mutational burden and prolonged clinical response to anti-PD-L1 antibody in platinum-resistant recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol Rep* 2017;21:78–80. DOI: 10.1016/j.gore.2017.06.013
- Konstantinopoulos P.A., Ceccaldi R., Shapiro G.I., D'Andrea A.D. Homologous recombination deficiency: exploiting the fundamental vulnerability of ovarian cancer. *Cancer Discov* 2015;5(11):1137–54. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-0714
- Frey M.K., Pothuri B. Homologous recombination deficiency (HRD) testing in ovarian cancer clinical practice: a review of the literature. *Gynecol Oncol Res Pract* 2017;4:4. DOI: 10.1186/s40661-017-0039-8
- Aliyeva T., Aktas B.Y., Gundogdu F. et al. The predictive role of PD-L1 expression and CD8 + TIL levels in determining the neoadjuvant chemotherapy response in advanced ovarian cancer. *J Ovarian Res* 2024;17(1):234. DOI: 10.1186/s13048-024-01533-x
- Morand S., Devanaboyina M., Staats H. et al. Ovarian cancer immunotherapy and personalized medicine. *Int J Mol Sci* 2021;22(12):6532. DOI: 10.3390/ijms22126532
- Ding L., Kim H.J., Wang Q. et al. PARP inhibition elicits STING-dependent antitumor immunity in BRCA1-deficient ovarian cancer. *Cell Rep* 2018;25(11):2972–80.e5. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.11.054
- Requesens M., Fojer F., Nijman H.W., de Bruyn M. Genomic instability as a driver and suppressor of anti-tumor immunity. *Front Immunol* 2024;15:1462496. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1462496
- Konstantinopoulos P.A., Waggoner S., Vidal G.A. et al. Single-arm phases 1 and 2 trial of niraparib in combination with pembrolizumab in patients with recurrent platinum-resistant ovarian carcinoma. *JAMA Oncol* 2019;5(8):1141–9. DOI: 10.1001/jamaoncol.2019.1048
- Fu Y.P., Lin H., Ou Y.C. et al. Bevacizumab as a mitigating factor for the impact of high systemic immune-inflammation index on chemorefractory in advanced epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer* 2024;24(1):1377. DOI: 10.1186/s12885-024-13087-8
- Haunschild C.E., Tewari K.S. Bevacizumab use in the frontline, maintenance and recurrent settings for ovarian cancer. *Future Oncol* 2020;16(7):225–46. DOI: 10.2217/fon-2019-0042
- Zsiros E., Lynam S., Attwood K.M. et al. Efficacy and safety of pembrolizumab in combination with bevacizumab and oral metronomic cyclophosphamide in the treatment of recurrent ovarian cancer: a phase 2 nonrandomized clinical trial. *JAMA Oncol* 2021;7(1):78–85. DOI: 10.1001/jamaoncol.2020.5945
- Lee E.K., Xiong N., Cheng S.C. et al. Combined pembrolizumab and pegylated liposomal doxorubicin in platinum resistant ovarian cancer: a phase 2 clinical trial. *Gynecol Oncol* 2020;159(1):72–8. DOI: 10.1016/j.ygyno.2020.07.028
- Park J.Y., Lee J.Y., Lee Y.Y. et al. Major clinical research advances in gynecologic cancer in 2021. *J Gynecol Oncol* 2022;33(2):e43. DOI: 10.3802/jgo.2022.33.e43
- Pawłowska A., Kwiatkowska A., Suszczyk D. et al. Clinical and prognostic value of antigen-presenting cells with PD-L1/PD-L2 expression in ovarian cancer patients. *Int J Mol Sci* 2021;22(21):11563. DOI: 10.3390/ijms222111563
- Kornepati A.V.R., Rogers C.M., Sung P., Curiel T.J. The complementarity of DDR, nucleic acids and anti-tumour immunity. *Nature* 2023;619(7970):475–86. DOI: 10.1038/s41586-023-06069-6
- Chabanon R.M., Rouanne M., Lord C.J. et al. Targeting the DNA damage response in immuno-oncology: developments and opportunities. *Nat Rev Cancer* 2021;21(11):701–17. DOI: 10.1038/s41568-021-00386-6

**Вклад авторов**

А.В. Султанбаев, И.А. Тузанкина, Д.А. Кудлай: разработка концепции и дизайна исследования, обзор и анализ литературы, сбор и обработка материала, статистическая обработка результатов, написание статьи, редактирование статьи, утверждение окончательного варианта статьи;

К.В. Меньшиков, А.Ф. Насретдинов, М.В. Султанбаев: обзор литературы, статистическая обработка результатов, редактирование статьи, утверждение окончательного варианта статьи;

Н.И. Султанбаева, Ш.И. Мусин: сбор и обработка материала, обзор литературы, статистическая обработка результатов, редактирование статьи, утверждение окончательного варианта статьи;

А.А. Измайлов, А.А. Измайлова, Е.А. Трошенков: редактирование статьи, утверждение окончательного варианта статьи.

**Author's contributions**

A.V. Sultanbaev, I.A. Tuzankina, D.A. Kudlay: development of the concept and design of the study, literature review and analysis, collection and processing of material, statistical processing of results, writing the article, editing of the article, approval of the final version of the article;

K.V. Menshikov, A.F. Nasretdinov, M.V. Sultanbaev: literature review, statistical processing of results, editing of the article, approval of the final version of the article;

N.I. Sultanbaeva, Sh.I. Musin: collection and processing of material, statistical processing of results, editing of the article, approval of the final version of the article;

A.A. Izmailov, A.A. Izmailova, E.A. Troshenkov: editing of the article, approval of the final version of the article.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

А.В. Султанбаев / A.V. Sultanbaev: <https://orcid.org/0000-0003-0996-5995>

И.А. Тузанкина / I.A. Tuzankina: <https://orcid.org/0000-0001-7496-0950>

К.В. Меньшиков / K.V. Menshikov: <https://orcid.org/0000-0003-3734-2779>

А.Ф. Насретдинов / A.F. Nasretdinov: <https://orcid.org/0000-0001-8340-7962>

Н.И. Султанбаева / N.I. Sultanbaeva: <https://orcid.org/0000-0001-5926-0446>

Ш.И. Мусин / Sh.I. Musin: <https://orcid.org/0000-0003-1185-977X>

А.А. Измайлов / A.A. Izmailov: <https://orcid.org/0000-0002-8461-9243>

М.В. Султанбаев / M.V. Sultanbaev: <https://orcid.org/0000-0002-2222-4940>

А.А. Измайлова / A.A. Izmailova: <https://orcid.org/0000-0003-0328-0944>

Е.А. Трошенков / E.A. Troshenkov: <https://orcid.org/0000-0003-2136-5028>

Д.А. Кудлай / D.A. Kudlay: <https://orcid.org/0000-0003-1878-4467>

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики.** Исследование одобрено локальным этическим комитетом ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Минздрава Республики Башкортостан, протокол от 21 июля 2022 г.

**Compliance with patient rights and principles of bioethics.** The study was approved by the local ethics committee of Republican Clinical Oncology Dispensary, Ministry of Health of the Republic of Bashkortostan, protocol on July 21, 2022.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interests.** Authors declare no conflict of interests.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН» (регистрационный номер НИОКТР 122020900136-4).

**Funding.** The work was supported by the framework of a state assignment for Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (Research & Development No. 122020900136-4).

Статья поступила: 16.05.2025. Принята к публикации: 20.10.2025. Опубликовано онлайн: 10.12.2025.

Article submitted: 16.05.2025. Accepted for publication: 20.10.2025. Published online: 10.12.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-39-46>

# Прогностическое значение интерлейкинов 6 и 8 в оценке эффективности терапии больных трижды негативным раком молочной железы

А.И. Черткова, И.Б. Шоуа, А.А. Борунова, З.Г. Кадагидзе, С.Л. Гуторов, Т.Н. Заботина

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

**Контакты:** Антонина Ивановна Черткова [antivch@yandex.ru](mailto:antivch@yandex.ru)

**Введение.** Интерлейкин (IL) 6 – мощный провоспалительный плейотропный цитокин, известный как ключевой фактор иммунного ускользания злокачественных клеток. IL-8 (CXCL8) – провоспалительный хемокин, высокие уровни экспрессии которого наблюдаются при различных видах рака.

**Цель исследования** – определить связь уровня цитокинов IL-6 и IL-8 в сыворотке крови с основными популяциями лимфоцитов периферической крови и значение этой связи для результатов неoadъювантной химиотерапии рака молочной железы с трижды негативным фенотипом (ТН РМЖ).

**Материалы и методы.** Пациентки с ТН РМЖ ( $n = 64$ ) получали химиотерапевтическое и оперативное лечение. Определяли концентрации IL-6 и IL-8 (нг/мл) в сыворотке крови и процентное содержание основных популяций лимфоцитов в периферической крови.

**Результаты.** Продемонстрирована взаимосвязь прогрессирования, метастазирования и гибели пациенток с более высокими концентрациями IL-6 в сыворотке крови больных ТН РМЖ. До лечения обнаружена положительная корреляция уровня IL-6 с процентным содержанием HLA-DR<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-лимфоцитов, которые, как ранее было показано, являются негативными прогностическими факторами при ТН РМЖ. Повышение уровня IL-6 сочеталось со снижением доли CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

**Заключение.** Полученные результаты согласуются с утверждением, что IL-6 является отрицательным прогностическим фактором у больных РМЖ. Обнаруженная в работе положительная взаимосвязь IL-6 с популяциями лимфоцитов HLA-DR<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> указывает на взаимодействие данного цитокина и перечисленных популяций в стимуляции опухолевого роста.

**Ключевые слова:** интерлейкин 6, интерлейкин 8, лимфоциты периферической крови, трижды негативный рак молочной железы

**Для цитирования:** Черткова А.И., Шоуа И.Б., Борунова А.А. и др. Прогностическое значение интерлейкинов 6 и 8 в оценке эффективности терапии больных трижды негативным раком молочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(4):39–46.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-39-46>

## Prognostic value of interleukins 6 and 8 in assessing the effectiveness of therapy in patients with triple-negative breast cancer

Antonina I. Chertkova, Ilona B. Shoua, Anna A. Borunova, Zaira G. Kadagidze, Sergey L. Gutorov, Tatiana N. Zabolina

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

**Contacts:** Antonina Ivanovna Chertkova [antivch@yandex.ru](mailto:antivch@yandex.ru)

**Background.** Interleukin (IL) 6 is a potent proinflammatory pleiotropic cytokine and is a key factor in the immune escape of malignant cells. IL-8 (or CXCL8) is a proinflammatory chemokine, high levels of expression of which were observed in various types of cancer.

**Aim.** To determine the relationship between the level of IL-6 and IL-8 cytokines in the blood serum with the main populations of peripheral blood lymphocytes and its significance for the results of neoadjuvant chemotherapy for triple-negative breast cancer (TN BC).

**Materials and methods.** All 64 patients received chemotherapy and surgery. The concentrations of IL-6 and IL-8 (ng/ml) in the blood serum and the percentage of the main lymphocyte populations in the peripheral blood (PB) were determined.

**Results.** The relationship between progression, metastasis and death of patients with higher IL-6 concentrations in the blood serum of patients with TN BC was demonstrated. Before treatment, a positive correlation was found between the IL-6 level and the percentage of HLA-DR, CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> lymphocytes, which, as previously shown, are negative prognostic factors in TN BC. An increase in the IL-6 level was combined with a decrease in the percentage of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes.

**Conclusion.** The obtained results are consistent with the position that IL-6 is a negative prognostic factor in patients with BC. The positive relationship between IL-6 and “negative” HLA-DR, CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> lymphocyte populations found in the work indicates their interaction in stimulating tumor growth.

**Keywords:** interleukin 6, interleukin 8, peripheral blood lymphocyte, triple-negative breast cancer

**For citation:** Chertkova A.I., Shoua I.B., Borunova A.A. et al. Prognostic value of interleukins 6 and 8 in assessing the effectiveness of therapy in patients with triple-negative breast cancer. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2025;24(4):39–46. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-39-46>

## Введение

Цитокины – биологически активные вещества пептидной природы, регулирующие широкий спектр процессов, протекающих в организме. Термин «цитокины» предложен N. Cohen в 1974 г. В то время считалось, что эти белки вырабатываются клетками иммунной системы, являясь одновременно и ее регуляторами [1]. В настоящее время хорошо известно, что цитокины продуцируются многими клетками, включая иммунные клетки, такие как макрофаги, В-, Т- и тучные клетки, а также эндотелиальные клетки, фибробласты, различные стромальные клетки и клетки некоторых злокачественных опухолей [2]. Сигнальные пути, опосредованные цитокинами, имеют основополагающее значение для иммунного гомеостаза организма, участвуя в развитии, активации, дифференцировке, функционировании различных иммунных клеток, во взаимодействии их друг с другом и их окружением [2]. Цитокины играют решающую роль при раке и воспалении, сопровождающем его [1–3]. Некоторые цитокины, такие как интерферон  $\gamma$ , интерлейкин (IL) 2 и IL-12 четко связаны с противоопухолевым иммунитетом, в то время как другие, такие как IL-6, 8, 1B, 23, 17 и 10, способствуют онкогенезу [2–4]. Так, IL-6 – гликопротеин с молекулярной массой 20–30 кДа, он синтезируется лимфоцитами, мононуклеарными фагоцитами, фибробластами, гепатоцитами, эндотелиальными, мезангиальными и другими клетками; IL-6 – мощный провоспалительный плеiotропный цитокин, основной член одноименного семейства цитокинов, который играет решающую роль при хроническом воспалении, аутоиммунных нарушениях, злокачественных новообразованиях, иммунных реакциях, гемопоэзе, метаболизме костной ткани, эмбриональном развитии и других фундаментальных процессах в организме [5]. Мишенями IL-6 являются активированные В-клетки, дендритные клетки, Т-клетки, CD4<sup>+</sup>-Т-клет-

ки, плазматические, гемопоэтические стволовые клетки, раковые клетки, макрофаги и эндотелиальные клетки [2]. Многочисленные исследования показали, что этот цитокин во многих случаях способствует образованию опухоли, и среди цитокинов он известен как ключевой фактор иммунного ускользания злокачественных клеток [2, 6]. Повышенные уровни IL-6 в сыворотке крови и опухолевом микроокружении продемонстрированы при многих злокачественных новообразованиях, включая рак молочной железы (РМЖ) [6, 7].

Хемокины – небольшие секреторные хемотаксические цитокины, которые контролируют направленную миграцию иммунных клеток. Хемокины имеют решающее значение для роста первичной опухоли, ее прогрессирования, включая поддержание пролиферации, выживание, старение опухолевых клеток, ангиогенез и метастазирование. В частности, IL-8 (или CXCL8) представляет собой провоспалительный хемокин, продуцируемый и экспрессируемый моноцитами, макрофагами, нейтрофилами, Т-клетками, фибробластами, эпителиальными клетками и сосудистыми эндотелиальными клетками. Высокие уровни экспрессии CXCL8 наблюдаются при различных видах рака. Секретция IL-8 некоторыми опухолевыми клетками способствует их рекрутированию, пролиферации и выживанию, подавляет активность CD (cluster of differentiation – кластера дифференцировки) 4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов и стимулирует клеточную секрецию дополнительных факторов роста, которые обеспечивают прогрессирование опухоли [8].

**Цель исследования** – определить связь уровня цитокинов IL-6 и IL-8 в сыворотке крови с основными популяциями лимфоцитов периферической крови и значение этой связи для результатов неoadъювантной химиотерапии (ХТ) РМЖ с трижды негативным фенотипом (ТН).

## Материалы и методы

**Исследуемая когорта.** В исследование включены 64 пациентки с ТН РМЖ (II–III стадии) в возрасте от 21 года до 77 лет, находившиеся на лечении в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Все больные получили 6 курсов неoadъювантной ХТ (паклитаксел 80 мг/м<sup>2</sup> в 1, 8, 15-й дни + цисплатин 75 мг/м<sup>2</sup> в 1-й день, цикл – 28 дней). По окончании курса ХТ проводили оперативное вмешательство. Определяли клинические показатели: прогрессирование заболевания (ПЗ), выживаемость без прогрессирования (ВБП), наличие метастазов (МТС) в лимфатических узлах (ЛУ).

**Иммунологические исследования.** Такого рода исследования проводили до ХТ и после ее окончания. В сыворотке крови концентрации IL-6 и IL-8 (нг/мл) определяли с использованием наборов реагентов для иммуноферментного анализа «Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ» и «Интерлейкин-8-ИФА-БЕСТ» («Вектор БЕСТ», Россия) на автоматическом иммуноферментном анализаторе Lazurite (Dunex Technologies Inc., США). Определение в периферической крови процентного содержания популяций лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Т-клеток), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> (активированных Т-клеток), CD19<sup>+</sup> (В-клеток), CD25<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> (активированных лимфоцитов), CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (natural killer T cells – естественных киллеров Т-клеток, НК-Т-клеток), CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (НК-клеток), CD3<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> (активированных В- и НК-клеток), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (регуляторных Т-клеток) осуществляли с помощью многопараметрового цитометрического анализа на проточном цитометре BD FACSCanto II (Becton, Dickinson and Company, США). Лимфоциты выделяли по параметрам светорассеяния и экспрессии маркера CD45. Для окрашивания клеток использовали

моноклональные антитела, конъюгированные с FITC (изотиоцианатом флуоресцеина), PE (фикоэритрином), PC5 (комплексом PE с цианином-5; eBiosciences, Beckman Coulter, Inc., США).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета специализированных программ Statistica 7.0 и SPSS Statistics 22 (США).

Использовали следующие критерии:

1. Колмогорова и Смирнова (для  $n \geq 50$ ) и Шапиро–Уилка (для  $n < 50$ ) для оценки характера распределения переменных.
2. Двусторонний точный критерий Фишера (Fisher exact  $p$  –  $F$ -тест) для определения наличия статистически значимой разницы между долями категорий в двух групповых переменных.
3. Двусторонний критерий Уилкоксона–Манна–Уитни (Wilcoxon rank-sum test or Mann–Whitney  $U$  test –  $U$ -критерий) для определения различий между независимыми группами больных.
4. Критерий знаковых рангов Уилкоксона (Wilcoxon matched pair test –  $W$ -критерий) для определения различий между зависимыми (до лечения и после него) группами больных.
5. Непараметрический корреляционный критерий Спирмена для определения взаимосвязи между переменными: определяли коэффициент корреляции « $\rho$ » и 95 % доверительный интервал [ $\rho$  (95 % ДИ)].

Уровень значимости во всех исследованиях был принят равным 0,05. Данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей ( $Q_1$ – $Q_3$  – 25 и 75 % процентиля). Уровень иммунологического показателя у конкретного больного определяли по отношению к Me этого показателя у всей группы больных в целом как «повышенный» ( $\geq$ Me) или «сниженный» ( $<$ Me).

**Таблица 1.** Взаимосвязь уровня интерлейкина 6 (IL-6, нг/мл) в сыворотке крови больных раком молочной железы с трижды негативным фенотипом с клиническим течением заболевания

**Table 1.** Relationship between the levels of blood serum interleukin 6 (IL-6, ng/ml) in the triple-negative breast cancer patients with the clinical course of the disease

Клиническое течение заболевания Clinical course of the disease	Концентрация IL-6, Me (квартили) IL-6 concentration, Me (quartiles)		$p^*$
Прогрессирование заболевания Disease progression	Да ( $n = 23$ ) Yes ( $n = 23$ )	Нет ( $n = 39$ ) No ( $n = 39$ )	0,015
	0,982 (0,326–0,917)	0,358 (0,196–0,832)	
Выживаемость Survival	Умерли ( $n = 15$ ) Died ( $n = 15$ )	Живы ( $n = 47$ ) Alive ( $n = 47$ )	0,03
	0,982 (0,326–0,983)	0,411 (0,196–1,046)	
Метастазы в лимфатических узлах Metastases in the lymph nodes	Да ( $n = 22$ ) Yes ( $n = 22$ )	Нет ( $n = 39$ ) No ( $n = 39$ )	0,025
	0,982 (0,326–0,917)	0,358 (0,196–0,832)	

## Результаты

### Исследование взаимосвязи исходной концентрации интерлейкина 6 в сыворотке крови с клиническими результатами лечения больных раком молочной железы с трижды негативным фенотипом

Уровень ИЛ-6 в сыворотке крови определяли до лечения у 64 пациенток, после лечения – у 49 больных. До лечения у всех пациенток этот показатель был в пределах нормы ( $N \leq 10$  нг/мл), после лечения у 3 женщин превышал норму: 11,9; 14,5 и 62,7 нг/мл соответственно. Медиана ИЛ-6 до лечения составляла 0,574 (0,211–1,251) нг/мл, после лечения – 0,798 (0,401–1,608) нг/мл. У больных с ПЗ, метастатическим поражением ЛУ и у умерших пациенток концентрация ИЛ-6 в сыворотке крови была выше, чем у больных без ПЗ, МТС и у живых пациенток (табл. 1).

При этом в группе с более высоким уровнем ИЛ-6 ( $\geq \text{Me}$ ) число больных с ПЗ, умерших пациенток и имеющих метастатическое поражение ЛУ было выше, чем в группе с концентрацией этого провоспалительного цитокина  $< \text{Me}$  (табл. 2).

### Исследование взаимосвязи уровня интерлейкина 6 с процентным содержанием лимфоцитов периферической крови больных раком молочной железы с трижды негативным фенотипом до лечения

Пациентки были разделены на 2 группы в зависимости от уровня ИЛ-6 в сыворотке крови у всех больных в каждой: в 1-й – исследуемый показатель  $\geq \text{Me}$ , во 2-й – наоборот,  $< \text{Me}$ . У больных в 1-й группе по сравнению с пациентками 2-й группы было статистически значимо снижена доля  $\text{CD8}^+\text{CD28}^-$ -лимфоцитов [6,85 (5,2–11,2) % и 10,3 (7,3–13,9) % соот-

ветственно;  $p = 0,011$ ,  $U$ -тест]. У пациенток в 1-й группе, в отличие от 2-й, отмечалась статистически значимая умеренная положительная связь концентрации этого цитокина с процентным содержанием лимфоцитов в периферической крови, экспрессирующих маркер поздней активации HLA-DR. Корреляцию наблюдали как в случае  $\text{CD3}^-\text{HLA-DR}^+$ -клеток (В- и NK-лимфоцитов), так и активированных  $\text{CD3}^+\text{HLA-DR}^+$ -Т-клеток, хотя во 2-м случае связь была менее выражена. Результаты исследования представлены в табл. 3.

В связи с обнаруженной положительной взаимосвязью ИЛ-6 с указанными популяциями лимфоцитов (см. табл. 3) мы исследовали также значимость последних для клинических результатов у больных ТН РМЖ. Оказалось, что в группе с долей  $\text{CD3}^+\text{HLA-DR}^+$ -лимфоцитов  $\geq \text{Me}$  ( $\text{Me}$  6,59 %) число больных с МТС в ЛУ было выше [9/21 (42,9 %)], чем в группе с процентным содержанием  $\text{CD3}^+\text{HLA-DR}^+ < \text{Me}$  [6/28 (21,4 %)]. Уровень  $\text{CD3}^+\text{HLA-DR}^+$ -лимфоцитов также отрицательно умеренно коррелировал с ВБП (ВБП-дни) [ $\rho$  (95 % ДИ) =  $-0,551$  ( $-0,781$  и  $-0,181$ );  $p = 0,006$ , критерий Спирмена],  $n = 23$ . В группе с количеством  $\text{CD3}^-\text{HLA-DR}^+$ -клеток  $\geq \text{Me}$  ( $\text{Me}$  6,05 %) (3-я группа) число умерших в процессе наблюдения больных [11/31 (35,5 %)] было статистически значимо выше, чем в группе с их более низким содержанием (4-я группа) [4/31 (12,9 %)];  $p = 0,037$  ( $F$ -тест). Число больных с МТС в ЛУ также было выше в 3-й группе [12/25 (48,0 %)], чем в группе 4 [5/27 (18,5 %)];  $p = 0,038$  ( $F$ -тест). В 3-й группе доля  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ -Т-клеток, [20 (12,2–27,8) %] была снижена по сравнению с аналогичным показателем в 4-й группе [25,6 (16,6–37,5) %];  $p = 0,040$  ( $U$ -тест).

Следует также отметить, что была обнаружена положительная корреляция ВБП с  $\text{CD4}^+$ -Т-клетками

**Таблица 2.** Значение уровня интерлейкина 6 (ИЛ-6, нг/мл) для результатов лечения рака молочной железы с трижды негативным фенотипом  
Table 2. The importance of interleukin 6 (IL-6, ng/ml) level for the results of treatment of triple-negative breast cancer

Подгруппа Subgroup	Число абс. в подгруппе/в группе (%) Number of abs. in a subgroup/ in a group (%)	Уровень ИЛ-6 в сыворотке крови в сравнении с медианным (Me) Serum IL-6 level compared with the median (Me)	$p^*$
С прогрессированием With progression	7/31 (22,6)	$< \text{Me}$	0,034
	16/31 (51,6)	$\geq \text{Me}$	
Умершие Deceased	5/31 (16,1)	$< \text{Me}$	0,235
	10/31 (32,3)	$\geq \text{Me}$	
С метастазами в лимфатических узлах With lymph node metastases	7/31 (22,6)	$< \text{Me}$	0,034
	15/30 (50,0)	$\geq \text{Me}$	

\* $p$  – точный критерий Фишера.

\* $p$  – Fisher exact two-tailed.

**Таблица 3.** Корреляция уровня интерлейкина 6 (IL-6, нг/мл) в сыворотке крови с процентным содержанием популяций лимфоцитов периферической крови больных раком молочной железы с трижды негативным фенотипом до лечения

Table 3. Correlation of blood serum interleukin 6 (IL-6, ng/ml) with the percentage of peripheral blood lymphocyte populations in patients with triple-negative breast cancer before treatment

Популяция лимфоцитов Lymphocyte population	Уровень IL-6 в группах IL-6 levels in groups			
	1-й: $\geq$ Me ( $n = 32$ ) 1 <sup>st</sup> : $\geq$ Me ( $n = 32$ )		2-й: $<$ Me ( $n = 32$ ) 2 <sup>nd</sup> : $<$ Me ( $n = 32$ )	
	$\rho$ (95 % ДИ)* $\rho$ (95 % CI)*	$p^{**}$	$\rho$ (95 % ДИ)* $\rho$ (95 % CI)*	$p^{**}$
HLA-DR	0,631 (0,400–0,773)	0	0,229 (–0,151–0,569)	0,208
CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	0,421 (0,098–0,665)	0,016	0,337 (–0,11–0,623)	0,059
CD3–HLA-DR <sup>+</sup>	0,475 (0,139–0,715)	0,006	–0,289 (–0,628–0,109)	0,108

\* $\rho$  (95 % ДИ) – коэффициент корреляции Спирмена (95 % доверительный интервал); \*\* $p$  – уровень значимости.

Примечание. Me – медианный уровень.

\* $\rho$  (95 % CI) – Spearman correlation coefficient (95 % confidence interval); \*\* $p$  – significance level.

Note. Me – median level.

[ $\rho$  (95 % ДИ) = 0,591 (0,249–0,809);  $p = 0,003$  (критерий Спирмена)].

#### Взаимосвязь уровня сывороточного интерлейкина 6 с популяциями лимфоцитов после лечения

После лечения IL-6 определяли у 49 пациенток, у 46 из них уровень данного цитокина был в пределах нормы [Me = 0,761 (0,323–1,509) нг/мл], а у 3 – превышал нормальные показатели (11,9, 14,5 и 62,7 нг/мл соответственно). У 45 из 49 женщин проводили сравнение концентрации IL-6 до лечения [Me ( $Q_1$ – $Q_3$ ) 0,348 (0,136–0,819) нг/мл] и после него [0,961 (0,401–1,608) нг/мл]. Уровень IL-6 после лечения был статистически значимо выше, чем до лечения:  $p = 0,001$  ( $W$ -критерий). Оказалось также, что у пациенток с уровнем IL-6 выше показателей нормы доля CD4<sup>+</sup>- и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов была значительно ниже [32,8 (26,1–42,1) % и 32,2 (25,6–41,9) % соответственно], чем в группе с нормальным уровнем IL-6 [47,6 (41,8–51,5) % и 47,4 (41,7–51,4) % соответственно].

#### Исследование взаимосвязи уровня интерлейкина 8 с показателями системного иммунитета

До лечения уровень ИЛ-8 определяли у 61 пациентки, после лечения – у 51. До лечения у 8 из 61 пациентки уровень данного цитокина оказался выше нормы [Me 12,2 (10,6–24,5) нг/мл], причем у 6 больных это повышение только незначительно превышало норму (от 10,4 до 14,4), а у 2 пациенток концентрация указанного хемокина была значительно выше нормы: 34,7 и 66,0 нг/мл соответственно. У остальных женщин Me 3,6 (2,2–6,5) нг/мл. После лечения уровень IL-8 был повышен у 7 пациенток. Различий в уровне IL-8 между живыми и умершими, с ПЗ и без такового, с МТС и без них не было ни до лечения,

ни после его завершения. Определение взаимосвязи IL-8 с иммунологическими показателями до лечения выявило положительную взаимосвязь содержания этого цитокина с процентным содержанием НК-клеток [ $\rho = 0,386$  (0,098–0,623);  $p = 0,005$  (критерий Спирмена)]. При этом у пациенток с нормальными показателями IL-8 уровень НК-клеток составил 10,1 (6,7–14,0) %,  $n = 42$ , у больных с концентрацией IL-8 выше – 18,4 (12,8–28,0) %,  $n = 9$ ;  $p = 0,010$  ( $U$ -критерий). У одной из пациенток с высоким уровнем обоих цитокинов (IL-6 – 62,7 нг/мл, IL-8 – 66,0 нг/мл) отмечали как значительное снижение доли CD4<sup>+</sup>Т-клеток в периферической крови (до 26,1 % при норме 35–46 %), так и резкое повышение уровня НК-клеток (до 40,4 % при норме 10–20 %).

#### Обсуждение

Повышение содержания IL-6 в сыворотке крови и опухолевой ткани, как правило, связано с плохим прогнозом заболевания. Высокие концентрации IL-6 в тканях РМЖ поддерживают агрессивный фенотип опухоли, а блокада этого цитокина снижает токсичность иммунотерапии и стимулирует противоопухолевый иммунитет [9–11]. Проведенные нами исследования продемонстрировали влияние исходного уровня IL-6 в сыворотке крови на результаты ХТ больных ТН РМЖ и подтвердили неблагоприятное значение этого цитокина при данном заболевании. Так, более высокий уровень IL-6 ( $\geq$ Me) был характерен для больных с ПЗ, умерших пациенток и больных с МТС в регионарных ЛУ по сравнению с пациентками с благоприятным течением заболевания. В группе с уровнем IL-6  $\geq$ Me доля пациенток с ПЗ, умерших и имеющих МТС в ЛУ, была выше, чем у больных с уровнем этого цитокина  $<$ Me. Таким образом,

полученные результаты указывают на необходимость учитывать тот факт, что небольшое повышение концентрации IL-6, даже в пределах нормы, может оказывать отрицательное влияние на эффективность проводимого лечения пациенток с ТН РМЖ.

Хорошо известно, что цитокины участвуют во взаимодействии иммунных клеток друг с другом и их окружением эндо-, пара- или аутокринным образом. Плейотропные эффекты цитокинов определяются тем, какие клетки экспрессируют цитокины, а какие клетки – рецепторы цитокинов, и последующие результаты могут различаться в зависимости от типа клеток и сигналов окружающей среды [2].

Мы исследовали взаимосвязь IL-6 с популяциями лимфоцитов периферической крови и обнаружили у пациенток с повышенным уровнем IL-6 статистически значимую положительную умеренную корреляцию уровня цитокина с лимфоцитами, экспрессирующими маркер поздней активации HLA-DR, как CD3-позитивными, так и CD3-негативными. Ранее мы показали, что эти популяции лимфоцитов являлись неблагоприятными факторами у пациенток с ТН РМЖ, получавших неoadьювантную ХТ [12]. Так, исходный уровень CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов, экспрессирующих маркер HLA-DR<sup>+</sup>, был повышен у больных с поздними стадиями данного заболевания. Повышенный до лечения уровень CD3<sup>+</sup>-HLA-DR<sup>+</sup>-лимфоцитов ассоциировался со статистически значимым уменьшением общей выживаемости пациенток, а также с выраженной тенденцией к сокращению безрецидивной выживаемости. Была выявлена также ассоциация исходно повышенного числа CD3<sup>+</sup>-HLA-DR<sup>+</sup>-В-лимфоцитов с более низкой степенью лечебного патоморфоза опухоли [12]. Результаты настоящего исследования подтвердили неблагоприятное значение этих клеток у больных ТН РМЖ. Так, у пациенток с ПЗ отмечали отрицательную взаимосвязь уровня CD3<sup>+</sup>-HLA-DR<sup>+</sup>-лимфоцитов с продолжительностью безрецидивного периода. Повышенное количество этих клеток сочеталось также с более высоким числом больных с МТС в ЛУ. Что касается популяции CD3<sup>+</sup>-HLA-DR<sup>+</sup>-клеток, в группе с их количеством  $\geq$ Me число умерших больных, а также число пациенток с МТС в ЛУ было статистически значимо выше, чем в группе с их более низким содержанием. Повышение уровня этих клеток сочеталось также со снижением в периферической крови доли CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов. Популяция CD3<sup>+</sup>-HLA-DR<sup>+</sup> является гетерогенной и содержит в своем составе активированные В- и НК-клетки. Как и в предыдущем исследовании, мы наблюдали сильную положительную связь CD3<sup>+</sup>-HLA-DR<sup>+</sup>-лимфоцитов с CD3<sup>+</sup>-CD19<sup>+</sup>-В-клетками [ $p = 0,702$  (549 и 0,832);  $p = 0,000$ ,  $n = 64$ ] [12] и умеренную – с долей НК-клеток, экспрессирующих перфорин, в составе популяции НК-лим-

фоцитов [ $p = 0,356$  (0,079 и 0,601);  $p = 0,031$ ,  $n = 37$ ]. Корреляция со всей популяцией CD3<sup>+</sup>-CD16<sup>+</sup>-NK-клеток отсутствовала [ $p = 0,199$  (-0,045 и 0,428);  $p = 0,116$ ,  $n = 64$ ].

Критически важную роль в осуществлении иммунных реакций против чужеродных агентов играют CD4<sup>+</sup>-Т-клетки. В противоопухолевом иммунном ответе CD4<sup>+</sup>-Т-клетки обеспечивают оптимизацию величины и качества ответа цитотоксических лимфоцитов [13]. В настоящем исследовании мы обнаружили положительную взаимосвязь CD4<sup>+</sup>-Т-клеток с безрецидивной выживаемостью пациенток с ТН РМЖ. В то же время высокая концентрация IL-6 в сыворотке крови отрицательно влияла на уровень CD4<sup>+</sup>-Т-клеток. Так, у пациенток с уровнем IL-6, превышающим норму ( $\geq 10$  нг/мл), процентное содержание CD4<sup>+</sup>-Т-клеток было снижено по сравнению с больными, имевшими нормальные значения данного показателя. Кроме того, мы наблюдали и уменьшение числа CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>-Т-клеток.

R. Huang и соавт. в исследовании ТН РМЖ продемонстрировали, что IL-8, секретируемый адипоцитами (один из основных стромальных компонентов), ремоделировал иммунное микроокружение опухоли не только путем подавления инфильтрации иммунных CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток, но и путем повышения экспрессии CD274 (PD-1 – programmed cell death 1, белок запрограммированной клеточной гибели 1) на клетках опухоли. Сочетанное воздействие на CXCL8 и блокирование PD-1 синергически усиливало иммунный ответ на опухоль и подавляло ее прогрессирование [14]. В настоящем исследовании в отличие от анализируемого показателя IL-6 мы не обнаружили различий в уровне IL-8 между живыми и умершими пациентками, с ПЗ и без такового, с МТС и без них ни до начала лечения, ни после его окончания. Вместе с тем выявлена положительная взаимосвязь содержания этого цитокина с процентным содержанием НК-клеток, которые, как было ранее показано, также являлись неблагоприятным фактором у больных ТН РМЖ. Так, у пациенток с исходно повышенным показателем активированных НК-клеток отмечали уменьшение безрецидивной и общей выживаемости по сравнению с больными со сниженным количеством этих лимфоцитов. Число пациенток с ПЗ в группе с повышенным процентным содержанием НК-клеток было в 2,2 раза больше, чем в группе больных с ПЗ, имеющих более низкий уровень указанного типа цитотоксических лимфоцитов [12].

### Заключение

Полученные в настоящем исследовании результаты согласуются с положением, согласно которому IL-6 является отрицательным прогностическим фак-

тором у больных РМЖ. Оказалось, что даже небольшое повышение концентрации IL-6 в сыворотке крови, хотя и в пределах нормы, может оказывать критически отрицательное влияние на эффективность проводимого лечения больных ТН РМЖ. В группе с уровнем IL-6  $\geq$ Me доля пациенток с ПЗ, умерших и имеющих МТС в ЛУ была выше, чем у больных с уровнем этого цитокина  $<$ Me. Повышенное содержание IL-6 в сыворотке крови отрицательно влияло на количество CD4<sup>+</sup>-Т-клеток, играющих критически важную роль в осуществлении противоопухолевых иммунных реакций, а также сочеталось

со снижением процентного содержания в ПК CD8<sup>+</sup>C-D28<sup>+</sup>-лимфоцитов-эффекторов. Ранее и в настоящем исследовании было показано, что CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>- и CD3<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-лимфоциты, а также НК-клетки являются неблагоприятными прогностическими факторами у больных ТН РМЖ. Обнаруженная положительная взаимосвязь IL-6 с CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>- и CD3<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-лимфоцитами, а IL-8 – с НК-клетками указывает на взаимодействие IL-6 и IL-8 с данными популяциями лимфоцитов в стимуляции опухолевого роста и снижении эффективности лечения больных ТН РМЖ.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Кадагидзе З.Г. Цитокины. Практическая онкология 2003;4(3):131–9. Kadagidze Z.G. Cytokines. Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology 2003;4(3):131–9. (In Russ.).
- Habanjar O., Bingula R., Decombat C. et al. Crosstalk of inflammatory cytokines within the breast tumor microenvironment. *Int J Mol Sci* 2023;24(4):4002. DOI: 10.3390/ijms24044002
- Kureshi C.T., Dougan S.K. Cytokines in cancer. *Cancer Cell* 2025;43(1):15–35. DOI: 10.1016/j.ccell.2024.11.011
- Briukhovetska D., Dörr J., Endres S. et al. Interleukins in cancer: from biology to therapy. *Nat Rev Cancer* 2021;21(8):481–99. DOI: 10.1038/s41568-021-00363-z
- Hirano T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *Int Immunol* 2021;33(3):127–48. DOI: 10.1093/intimm/dxaa078
- Masjedi A., Hashemi V., Hojjat-Farsangi M. et al. The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer. *Biomed Pharmacother* 2018;108:1415–24. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.09.177
- Knüpfer H., Preiss R. Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review). *Breast Cancer Res Treat* 2007;102(2):129–35. DOI: 10.1007/s10549-006-9328-3
- Raza S., Rajak S., Tewari A. et al. Multifaceted role of chemokines in solid tumors: From biology to therapy. *Cancer Biol* 2022;86(Pt 3):1105–21. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.12.011
- Dethlefsen C., Hojfeldt G., Hojman P. The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2013;138(3):657–64. DOI: 10.1007/s10549-013-2488-z
- Hailemichael Y., Johnson D.H., Abdel-Wahab N. Interleukin-6 blockade abrogates immunotherapy toxicity and promotes tumor immunity. *Cancer Cell* 2022;40(5):509–23.e6. DOI: 10.1016/j.ccell.2022.04.004
- Sansone P., Storci G., Tavorari S. et al. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. *J Clin Invest* 2007;117(12):3988–4002. DOI: 10.1172/JCI32533
- Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Заботина Т.Н. и др. Взаимосвязь маркеров ранней и поздней активации лимфоцитов с эффективностью неoadъювантной химиотерапии больных трижды негативным раком молочной железы. *Иммунология* 2021;42(2):112–24. DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-2-112-124
- Kadagidze Z.G., Chertkova A.I., Zabolina T.N. et al. The relationship of markers of early and late lymphocytes activation with the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy in patients with triple negative breast cancer with the efficiency of neoadjuvant chemotherapy in triple negative breast cancer patients. *Immunologiya = Immunology* 2021;42(2):112–24. (In Russ.). DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-2-112-124
- Borst J., Ahrends T., Bąbala N. et al. CD4<sup>+</sup> T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2018;18(10):635–47. DOI: 10.1038/s41577-018-0044-0
- Huang R., Wang Z., Hong J. et al. Targeting cancer-associated adipocyte-derived CXCL8 inhibits triple-negative breast cancer progression and enhances the efficacy of anti-PD-1 immunotherapy. *Cell Death Dis* 2023;14(10):703. DOI: 10.1038/s41419-023-06230-z

### Вклад авторов

А.И. Черткова: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи, анализ и интерпретация данных, написание текста рукописи;

И.Б. Шоуа, А.А. Борунова: получение данных для анализа, редактирование рукописи;

З.Г. Кадагидзе: обзор публикаций по теме статьи;

С.Л. Гуроров: предоставление материала для исследования, редактирование рукописи;

Т.Н. Заботина: разработка дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, обсуждение и научное редактирование рукописи.

### Author's contributions

A.I. Chertkova: development of research design, obtaining data for analysis, reviewing publications on the topic of the article, analysis and interpretation of data, interpreting data, writing the text of the manuscript;

I.B. Shoua, A.A. Borunova: obtaining data for analysis, editing of the manuscript;

Z.G. Kadagidze: review of publications on the subject of the article;

S.L. Gutorov: providing research material, editing of the manuscript;

T.N. Zabolina: development of research design, analysis and interpretation of data, discussion and scientific editing of the manuscript.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

А.И. Черткова / A.I. Chertkova: <https://orcid.org/0000-0001-9146-5986>

И.Б. Шоа / I.B. Shoua: <https://orcid.org/0000-0002-9488-4710>

А.А. Борунова / A.A. Borunova: <https://orcid.org/0000-0002-1854-3455>

З.Г. Кадагидзе / Z.G. Kadagidze: <https://orcid.org/0000-0002-0058-0987>

С.Л. Гуторов / S.L. Gutorov: <https://orcid.org/0000-0001-5912-1155>

Т.Н. Заботина / T.N. Zabolina: <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 темы научно-исследовательской работы № И123021000086-7.

**Funding.** The work was carried out within the framework of the research topic No. И123021000086-7.

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики.** Все пациентки подписали форму добровольного информированного согласия на публикацию медицинской информации.

**Compliance with patient rights and principles of bioethics.** Written consent was obtained from the patients for publication of relevant medical information.

Статья поступила: 05.06.2025. Принята к публикации: 20.10.2025. Опубликовано онлайн: 10.12.2025.

Article submitted: 05.06.2025. Accepted for publication: 20.10.2025. Published online: 10.12.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-47-55>

# Противоопухолевый потенциал галловой кислоты на модели индуцированного 1,2-диметилгидразином канцерогенеза

Н.И. Рыжова, В.П. Дерягина, Л.А. Савлучинская, И.С. Голубева, Л.В. Кривошеева, К.И. Кирсанов

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

**Контакты:** Людмила Александровна Савлучинская [blood-research@yandex.ru](mailto:blood-research@yandex.ru)

**Введение.** Разработка средств онкопрофилактики остается актуальной. Галловая кислота (ГК), обладающая антиоксидантной, противовоспалительной, противовирусной активностью, применяется для лечения многих заболеваний. Противоопухолевые свойства ГК показаны в основном на клеточных культурах. Модели химически индуцированного канцерогенеза имеют больше возможностей для раскрытия антиканцерогенного потенциала ГК.

**Цель исследования** – на модели индуцированного 1,2-диметилгидразином (1,2-ДМГ) канцерогенеза у мышей изучить антиканцерогенное действие ГК на его различных этапах, оценить влияние ГК на эндогенный синтез метаболитов оксида азота (NO).

**Материалы и методы.** Мыши линии СВА (94 самки) были распределены на 5 групп: контроль, ГК, 1,2-ДМГ, ГК + 1,2-ДМГ, 1,2-ДМГ + ГК. Определяли частоту, множественность и морфологические характеристики опухолей. Метаболиты NO оценивали по выделению нитрит-ионов ( $\text{NO}_2^-$ ) с мочой спектрофотометрическим методом.

**Результаты.** Частота опухолей у животных, получивших 1,2-ДМГ, составила 100 %. Применение ГК до введения курса канцерогена и на протяжении всего эксперимента приводило к статистически значимому снижению опухолей кишечника. При воздействии ГК после курса 1,2-ДМГ эффект был более сильным и вызывал торможение роста всех диагностированных опухолей. Показатель множественности опухолей в этой группе был статистически значимо ниже по сравнению с показателями у животных, получивших только канцероген ( $p < 0,01$ ). Анализ синтеза метаболитов NO показал, что ГК препятствует выделению нитритов ( $\text{NO}_2^-$ ), способствуя торможению развития индуцированных канцерогеном опухолей.

**Заключение.** Показано антиканцерогенное действие ГК на различных этапах индуцированного 1,2-ДМГ канцерогенеза. Отмечено выраженное снижение частоты и множественности всех индуцированных опухолей у мышей, получивших ГК на стадиях промоции и прогрессии. Ингибирующие эффекты ГК, обнаруженные при ее использовании как до введения канцерогена, так и после этого, обосновывают ее воздействие на всех стадиях канцерогенного процесса. Полученные данные расширяют возможности рассмотрения ГК в качестве перспективного препарата в химиопрофилактике и последующем использовании в онкологической практике.

**Ключевые слова:** галловая кислота, 1,2-диметилгидразин, канцерогенез, индуцированная опухоль, химиопрофилактика

**Для цитирования:** Рыжова Н.И., Дерягина В.П., Савлучинская Л.А. и др. Противоопухолевый потенциал галловой кислоты на модели индуцированного 1,2-диметилгидразином канцерогенеза. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(4):47–55.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-47-55>

## Antitumor potential of gallic acid on a model of 1,2-dimethylhydrazine-induced carcinogenesis

Natalia I. Ryzhova, Valentina P. Deryagina, Ludmila A. Savluchinskaya, Irina S. Golubeva, Leylya V. Krivosheeva, Kirill I. Kirsanov

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

**Contacts:** Ludmila Aleksandrovna Savluchinskaya [blood-research@yandex.ru](mailto:blood-research@yandex.ru)

**Background.** Search and development of cancer prevention agents remain relevant. Gallic acid (GA), which has antioxidant, anti-inflammatory, and antiviral activities, is used to treat many diseases. The antitumor properties of GA have been demonstrated mainly in cell cultures. Models of chemically induced carcinogenesis have more possibilities to reveal the anticancer potential of GA.

**Aim.** To study the antitumor effect of GA at various stages using a model of 1,2-DMH-induced carcinogenesis in mice. To evaluate the effect of GA on the endogenous synthesis of nitric oxide (NO) metabolites.

**Materials and methods.** CBA line mice (94 females) were divided into 5 groups: Control, GA, 1,2-DMH, GA + 1,2-DMH, 1,2-DMH + GA. The frequency, multiplicity, and morphological characteristics of tumors were determined. NO metabolites were assessed by  $\text{NO}_2^-$  excretion in urine using a spectrophotometric method.

**Results.** The tumor incidence in animals that received only 1,2-DMH was 100 %. The use of GA before the carcinogen course and throughout the experiment resulted in a moderate decrease in the incidence of intestinal tumors. When GA was administered after the 1,2-DMH course, the effect was stronger and inhibited the growth of all diagnosed tumors. The multiplicity index of tumors in this group was significantly lower compared to that of animals receiving only the carcinogen ( $p < 0.01$ ). Analysis of NO metabolite synthesis showed that GC prevents the excretion of nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ), contributing to the inhibition of carcinogen-induced tumor development.

**Conclusion.** The antitumor effect of GA at various stages of 1,2-DMH-induced carcinogenesis was demonstrated. A significant decrease in the frequency and multiplicity of induced and malignant tumors of all localizations was noted in mice that received GA at the stage of carcinogenesis, including the stages of promotion and progression. The inhibitory effects of GA, detected when used both before and after the introduction of the carcinogen, substantiate its effect on all stages of the carcinogenic process. The data obtained expand the possibilities of considering GA as a promising drug in chemoprophylaxis and subsequent use in oncological practice.

**Keywords:** gallic acid, 1,2-dimethylhydrazine, carcinogenesis, induced tumor, hemoprolylaxis

**For citation:** Ryzhova N.I., Deryagina V.P., Savluchinskaya L.A. et al. Antitumor potential of gallic acid on a model of 1,2-dimethylhydrazine-induced carcinogenesis. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2025;24(4):47–55. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-47-55>

## Введение

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, онкологические заболевания занимают 2-е место по смертности после сердечно-сосудистых болезней, вызывая гибель более 9 млн человек в год [1]. Лечение злокачественных новообразований включает лучевую, химио-, иммуно-, гормоно- и другие виды терапии. Химиотерапия остается основным методом терапии злокачественных опухолей, однако ее применение, как правило, сопровождается развитием резистентности, токсичности и характеризуется низкими показателями ответа. Соединения растительного происхождения используются для разработки противоопухолевых препаратов, среди них известны такие, как этопозид, паклитаксел, винкристин. Галловая кислота (ГК, 3,4,5-тригидроксибензойная кислота) является одним из растительных полифенолов и применяется для лечения бактериальных и вирусных инфекций, а также воспалительных, нейродегенеративных и желудочно-кишечных заболеваний [2]. Противоопухолевые свойства ГК изучены в основном на опухолевых клеточных культурах легких, предстательной железы, желудка, толстой кишки, кожи и др. [3]. Терапевтический потенциал ГК заключается в опосредованном ингибировании экспрессии онкогенов и матриксных металлопротеиназ путем регулирования выработки активных форм

кислорода (АФК) и воздействия на апоптоз, клеточный цикл, миграцию, метастазирование [4]. Внедрению ГК в клиническую практику может способствовать изучение ее противоопухолевого потенциала с помощью экспериментальных систем *in vivo*, в том числе на моделях химически индуцированного канцерогенеза. Показано, что модель 1,2-диметилгидразин (1,2-ДМГ)-индуцированного канцерогенеза может быть использована для изучения влияния соединений на процесс канцерогенеза и его отдельные стадии с целью исследования полученных антиканцерогенных эффектов в зависимости от дозы, времени и способов введения, а также от линии и пола животных [5, 6]. Использование 1,2-ДМГ вызывает индукцию широкого спектра опухолей в различных органах и локализациях: кишечнике, печени, почках, матке, анальной области, которые имеют определенное сходство со злокачественным опухолевым ростом у человека, что является несомненным преимуществом данной модели [7, 8]. Процесс канцерогенеза отчасти связывают с перепроизводством АФК и активных форм азота, что приводит к повреждению ДНК, возникновению мутаций в онкогенах, а также эпигенетическому подавлению генов — супрессоров опухоли [9]. Можно ожидать, что ГК, обладающая антиоксидантным потенциалом, будет способствовать нейтрализации АФК и активных форм азота.

В наших работах на перевиваемых, индуцированных и спонтанных опухолях показано, что опухолевая прогрессия происходит на фоне высоких, характерных для нитрозативного стресса уровнях эндогенного образования производных оксида азота (NO) – нитратов натрия + нитритов натрия – и повышенной экспрессии индуцибельной (iNOS) и эндотелиальной NO-синтазы в опухолевых клетках и сосудах при выраженной гетерогенности их экспрессии [10, 11].

**Цель исследования** – на модели индуцированно-го 1,2-ДМГ канцерогенеза у мышей изучить антиканцерогенное действие ГК на его различных этапах, оценить влияние ГК на эндогенный синтез метаболитов NO.

### Материалы и методы

В работе использовали следующие вещества: аммония гидроксида раствор («Химреактив», Россия), ГК («РусХим», Россия), гексацианоферрат калия («ЛенРеактив», Россия); гематоксилин, модифицированный Майера (Abcam, США), гепарин («Синтез», Россия), 1,2-ДМГ 2-HCl (Qingdao Sigma Chemical Co., Ltd., Китай), зимозан А (Sigma-Aldrich, США), люминол (Sigma-Aldrich, США), N-(1-нафтил)этилендиамин дигидрохлорид («ЛенРеактив», Россия) и др.

Исследование проведено на 94 мышах линии СВА (самках в возрасте 1,5 мес с массой тела 22–24 г), которые были получены из разведения НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Животных содержали в стандартных пластиковых клетках со свободным доступом к брикетированному корму и воде. Перед началом эксперимента все животные были взвешены, помечены и рассажены в клетки. Показатели массы тела животных регистрировали еженедельно на протяжении всего опыта. Мыши были распределены на 5 групп:

1-я ( $n = 10$ ) – контроля;

2-я ( $n = 10$ ) – ГК (с 21-й недели до окончания эксперимента);

3-я ( $n = 28$ ) – 1,2-ДМГ (в течение 20 нед);

4-я ( $n = 28$ ) – ГК + 1,2-ДМГ (ГК за 3 нед до 1-й инъекции 1,2-ДМГ и до окончания опыта);

5-я ( $n = 18$ ) – 1,2-ДМГ + ГК (ГК после 20-недельного курса введения 1,2-ДМГ и до конца опыта).

Индукцию опухолей проводили 1,2-ДМГ в дозе 3,6 мг/кг/сут, который вводили мышам 3, 4 и 5-й групп 1 раз в неделю в течение 20 нед подкожно в межлопаточную область. Водный раствор ГК животные 2, 4 и 5-й групп получали через желудочный зонд из расчета 20 мг/кг/сут согласно выбранным схемам опыта. При выполнении исследований были соблюдены этические нормы работы с экспериментальными животными, которые не противостоят требованиям этической экспертизы (выписка из протокола комиссии по биоэтике НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохи-

на № 08-b-24 от 22.10.2024). В конце эксперимента, на 322-й день, мышей усыпляли под эфирным наркозом. Обнаруженные при вскрытии опухоли и органы с видимыми изменениями брали для гистологического исследования с последующей морфологической диагностикой и определением частоты и множественности опухолей в каждой группе. При постановке диагноза опухолей руководствовались классификацией канцерогенных факторов Международного агентства по изучению рака [12].

Эндогенный синтез метаболитов NO оценивали по выделению  $\text{NO}_2^-$  с мочой за сутки у мышей 3 групп: контроля (1-я группа), 1,2-ДМГ (3-я группа), ГК + 1,2-ДМГ (4-я группа). Мышей помещали по 6 особей в обменные клетки, лишив корма при свободном доступе к дистиллированной воде. Для предотвращения микробиологического восстановления нитрата натрия до нитрита натрия использовали водный раствор амоксиклава в концентрации, соответствующей 60 мкг в расчете на 1 мл собранной мочи. Анализ синтеза метаболитов проводили спектрофотометрическим методом с применением реагента Грисса [13]. Величину оптической плотности раствора измеряли на спектрофотометре «ЛОМО СФ-46» (Россия) при длине волны, равной 540 нм. Статистическую обработку осуществляли по критерию  $t$ -теста Стьюдента,  $T$ -критерию Уилкоксона и критерию  $\chi^2$  Пирсона [14].

### Результаты

Предложенная модель индуцированного 1,2-ДМГ канцерогенеза способствовала получению результатов воздействия ГК на процесс канцерогенеза в разных стадиях.

**Первая группа (контроль).** У 1 животного было обнаружено кистозное новообразование яичника.

**Вторая группа (ГК).** При применении ГК в течение всего эксперимента у 3 животных развились доброкачественные опухоли: у 2 мышей – кисты яичников и печени, у 1 животного была аденома легких. Аденокарциному эндометрия матки диагностировали еще у 1 мыши.

**Третья группа (1,2-ДМГ).** В этой группе количество мышей с индуцированными добро- и злокачественными опухолями достигло 100 % (табл. 1). Из них у 25 (93 %) животных были диагностированы опухоли печени, которые представляли собой гепатоцеллюлярные аденомы и карциномы. Среди других опухолей печени обнаружены сосудистые опухоли, такие как гемангиомы, характеризующиеся аномальными сосудистыми пространствами, выстланными эндотелиальными клетками, а также злокачественные опухоли – гемангиоэндотелиомы или гемангиосаркомы, характеризующиеся выраженной клеточной атипией. В кишечнике, репродуктивных органах

(яичниках, матке и маточных трубах) и легких частота опухолей, индуцированных 1,2-ДМГ, составила 74, 48 и 37 % соответственно по отношению к эффективному числу (табл. 2). Опухоли толстой кишки мышей были представлены доброкачественными полипами, а также злокачественными аденокарциномами.

**Четвертая группа (ГК + 1,2-ДМГ).** Животные этой группы начинали получать ГК за 3 нед до индукции опухолей канцерогеном и продолжали на протяжении всего опыта. Частота возникновения добро- и злокачественных опухолей толстой кишки составила 39 %. Она была ниже частоты, равной 74 % в группе животных, получавшей только канцероген ( $p < 0,01$ ). Частота появления аденокарцином толстой кишки также была снижена по сравнению с показателями группы, где использовали канцероген, и составила 7,1 % ( $p < 0,01$ ; см. табл. 2). Были также отмечены опухоли печени: злокачественные (60,7 %) и доброкачественные + злокачественные (79 %). Число животных с опухолями репродуктивных органов соответствовало 17,8 % (злокачественные) и 46 % (доброкачественные + злокачественные).

**Пятая группа (1,2-ДМГ + ГК).** У мышей этой группы ГК применяли после 20 еженедельных инъекций 1,2-ДМГ до конца опыта. На основании полу-

ченных результатов зафиксирован выраженный эффект ГК по отношению к опухолям толстой кишки и репродуктивным органам. Частота новообразований кишечника составила 23 %, т.е. была ниже по сравнению с частотой опухолей 74 % в 3-й группе, где мышам вводили канцероген ( $p < 0,01$ ). Частота опухолей репродуктивных органов также была ниже и равнялась 12 % по сравнению с частотой 48 % в 3-й группе ( $p < 0,05$ ). Общее количество новообразований в репродуктивных органах мышей было в 4 раза, а злокачественных — в 5 раз ниже по сравнению с соответствующими показателями в 3-й группе (см. табл. 2). Регистрировали также влияние ГК на объем сосудистых опухолей печени. Среднее значение объемов таких опухолей в 5-й группе было в 4 раза ниже, чем в 3-й группе ( $p = 0,02$ ). Более того, показатель множественности в ней, рассчитанный с учетом всех опухолей, а также только злокачественных, был статистически значимо ниже соответственно в 2,6 и 2,7 раза по сравнению с группой, получавшей только канцероген ( $p < 0,01$ ; см. табл. 1).

Определение действия ГК на эндогенный биосинтез стабильных метаболитов аэробного окисления  $\text{NO}-\text{NO}_2^-$  (по выделению  $\text{NO}_2^-$  с суточной мочой) у мышей 4-й группы показало выраженное ингибирование образования  $\text{NO}_2^-$ , в то время как при действии

**Таблица 1.** Влияние галловой кислоты (ГК) на частоту и множественность опухолей, индуцированных 1,2-диметилгидразином (1,2-ДМГ) у мышей-самок линии CBA

Table 1. Effect of gallic acid (GA) on the frequency and multiplicity of tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine (1,2-DMH) in female CBA mice

Группа Group	Количество мышей, абс. Number of mice, abs.	Эффектив- ное число Effective number	Количество мышей с опухолями, абс. (%*) Number of mice with tumors, abs. (%*)		Количество всех опухолей (злокачествен- ных), абс. (%) Number of all tumors (malignant), abs. (%)	Коэффициент множе- ственности опухолей Multiplicity coefficient of tumors	
			доброкачест- венными + злока- чественными benign + malignant	злокаче- ственными malignant		всех all	злокаче- ственных malignant
1-я: контроль 1 <sup>st</sup> : control	10	10	1 (10,0)	1 (10,0)	1 (0)	0	0
2-я: ГК 2 <sup>nd</sup> : GA	10	10	4 (40,0)	1 (10,0)	9 (1,0)	2,25 ± 1,26	0,1
3-я: 1,2-ДМГ 3 <sup>rd</sup> : 1,2-DMH	28	27	27 (100)	22 (81,0)	109 (71,0)	4,0 ± 2,0	3,2 ± 1,85
4-я: ГК + 1,2-ДМГ 4 <sup>th</sup> : GA + 1,2-DMH	28	28	26 (93,0)	21 (75,0)	87 (54,0)	3,35 ± 1,7	2,57 ± 1,4
5-я: 1,2-ДМГ + ГК 5 <sup>th</sup> : 1,2-DMH + GA	17	17	15 (88,0)	11 (65,0)	23 (13,0)	1,53 ± 0,91**	1,18 ± 0,6**

\*Проценты рассчитывали по отношению к эффективному числу, различие между 5-й и 3-й группами статистически значимо.

\*\* $p < 0,01$ .

\*Percentages were calculated in relation to the effective number, the difference between 5<sup>th</sup> and 3<sup>rd</sup> groups is statistically significant.

\*\* $p < 0,01$ .

**Таблица 2.** Влияние галловой кислоты (ГК) на количество и локализацию опухолей, индуцированных 1,2-диметилгидразином (1,2-ДМГ) у мышей-самок линии СВА

**Table 2.** Effect of gallic acid (GA) on the number and localization of tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine (1,2-DMH) in female CBA mice

Локализация опухолей Localization of tumors	Экспериментальная группа, абс. (%) Experimental group, abs. (%)									
	1-я: контроль 1 <sup>st</sup> : control		2-я: ГК 2 <sup>nd</sup> : GA		3-я: 1,2-ДМГ 3 <sup>rd</sup> : 1,2-DMH		4-я: ГК + 1,2-ДМГ 4 <sup>th</sup> : GA + 1,2-DMH		5-я: 1,2-ДМГ + ГК 5 <sup>th</sup> : 1,2-DMH + GA	
	з m	з + д m + b	з m	з + д m + b	з m	з + д m + b	з m	з + д m + b	з m	з + д m + b
Печень Liver	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (30,0)	21 (62,9)	25 (93,0)	17 (60,7)	22 (79,0)	7 (41,1)	9 (53,0)*
Толстая кишка + перианальная область Large intestine + perianal area	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (29,6)	20 (74,0)	2 (7,1)**	11 (39,0)**	2 (11,8)	4 (23,0)**
Репродуктивные органы (яичники, матка, маточные трубы) Reproductive organs (ovaries, uterus, fallopian tubes)	0 (0)	1 (10,0)	1 (10,0)	3 (30,0)	8 (29,6)	13 (48,0)	5 (17,8)	13 (46,0)	1 (5,9)*	2 (12,0)*
Легкие Lungs	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10,0)	5 (18,5)	10 (37,0)	2 (11,0)	11 (39,0)	2 (11,8)	6 (35,0)
Другие органы (почки, селезенка, брыжейка) Others organs (kidneys, spleen, mesentery)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (7)	4 (15,0)	1 (5,6)	1 (4,0)	0 (0)	0 (0)
Всего животных с опухолями Total animals with tumors	0 (0)	1 (10,0)	1 (10,0)	4 (40,0)	22 (81,0)	27 (100)	21 (75,0)	26 (92,9)	11 (65,0)	15 (88,0)

**Примечание.** Количество животных: з – со злокачественными опухолями; з + д – со злокачественными + доброкачественными опухолями. Различие 4-й и 5-й групп с 3-й группой статистически значимо (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

**Note.** The number of animals: m – with malignant tumors; m + b – with malignant + benign tumors. The difference between 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> groups and 3<sup>rd</sup> group is statistically significant (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

канцерогена выделение  $\text{NO}_2^-$  соответствовало  $(1,15 \pm 0,25) \times 10^{-7}$  моль/кг массы у животных 3-й группы. В 1-й группе (контроля) выделения  $\text{NO}_2^-$  не обнаружено. Полученные результаты показывают, что введение ГК, блокируя синтез метаболитов, замедляет развитие опухолей.

### Обсуждение

Доказательства терапевтической активности растительных полифенолов вместе с данными об их взаимодействии с клеточными мишенями позволяют рассматривать их как перспективные для использования в химиопрофилактике и лечении рака. Современная концепция профилактики предусматривает целенаправленное воздействие растительных соединений, обладающих противоопухолевыми свойствами, на все (или отдельные) этапы многоступенчатого процесса канцерогенеза: инициацию, промоцию и прогрессию для торможения злокачественного

роста. В то же время действие полифенолов на большее число молекулярных мишеней требует уточнения их влияния на многоэтапный процесс канцерогенеза с анализом ключевых механизмов, лежащих в основе их ингибирующих эффектов, учитывая, что химиопрофилактические соединения могут различаться не только механизмами, но и избирательностью действия в зависимости от стадии процесса [15]. Исследования противоопухолевого действия полифенолов с применением различных моделей спонтанного и индуцированного канцерогенеза проведены главным образом с использованием галлатов – сложных эфиров ГК, содержащихся в черном и зеленом чае. Ингибирующие эффекты галлатов отмечались на опухолях легких, индуцированных канцерогенами 4-(метилнитрозамино)-1-(3-пиридил)-1-бутанолом (NNK), бензо[а]пиреном (BP) и N-нитрозодиметиламином (NDMA), и спонтанных опухолях легких у мышей A/J; опухолях ротовой полости у хомяков, индуцированных

7,12-диметилбенз[а]антраценом (DMBA); опухолях пищевода и желудка, индуцированных N-нитрозометилбензиламином (NMBA) и N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином (MNNG) у крыс [16–18]. Приведенные данные литературы свидетельствуют о том, что ингибирующее действие галлатов проявлялось на всех стадиях индуцированного канцерогенеза при использовании различных моделей и канцерогенов. Снижение частоты и множественности опухолей было обусловлено механизмами ингибирования клеточной пролиферации, индукции апоптоза и ингибированием ангиогенеза [19].

Проведение исследований, связанных с изучением химиопрофилактической активности ГК на модели 1,2-ДМГ-индуцированного канцерогенеза, в свою очередь, может расширить возможности дальнейшего терапевтического использования ГК.

**Опухоли печени.** Полученные нами результаты при применении ГК после курса 1,2-ДМГ на стадиях промоции и прогрессии показали, что наибольшее снижение частоты, составившее 53 %, касалось опухолей печени. Отмеченное среди них снижение частоты в 1,75 раза гепатоцеллюлярных аденом и карцином, возможно, связано с наличием у этих опухолей антиоксидантных и противовоспалительных свойств. Это подтверждается результатами другой работы, где выявлено снижение уровней антиоксидантных ферментов: аспартаттрансферазы, аланин-трансферазы, щелочной и кислой фосфатаз при действии ГК на гепатоцеллюлярные карциномы, индуцированные N-диэтилнитрозамином у крыс-альбиносов линии Wistar [20]. Продемонстрированная способность ГК индуцировать активность каспаз-3, -9 и АФК и снижать мембранный потенциал митохондрий на клетках гепатоцеллюлярных карцином SMMC-7721 человека подтверждает предположение о том, что ГК может быть потенциально новым соединением для их лечения [21].

**Сосудистые опухоли печени.** При той же схеме использования ГК нами было отмечено ингибирующее влияние ГК на размеры сосудистых опухолей печени ( $p = 0,02$ ). Это, в свою очередь, вероятно, связано с ингибированием ангиогенеза путем подавления VEGF (vascular endothelial growth factor – фактор роста эндотелия сосудов) через сигнальный путь PTEN/АКТ/HIF-1 $\alpha$ /VEGF. На основании данных литературы показано, что постоянная активация транскрипционных факторов HIF-1 и -2 (hypoxia-inducible factor – факторов, индуцируемых гипоксией), ассоциированных с опухолевым супрессором фон Гиппеля–Линдау (pVHL), при его потере приводит к развитию сосудистых опухолей в различных органах. В исследовании приводятся доказательства того, что HIF-2 является важнейшим регулятором экспрессии ангиогенных генов и сосудистого опухо-

леобразования в печени с дефицитом pVHL и, следовательно, может представлять собой терапевтическую мишень для лечения данных опухолей, связанных с дефицитом VHL [22]. Этиология гемангиосаркомы печени изучена плохо, и, как следствие, прогноз для пациентов с этим заболеванием крайне неблагоприятный. Часто наблюдается инактивация локуса CDKN2A, в котором находятся гены-супрессоры опухолей *Arf* и *p16 (INK4a)*. У мышей с гомозиготной делецией *Arf* наблюдалось повышение частоты гемангиом и гемангиосарком после воздействия канцерогена, это свидетельствует о том, что потери *Arf* могут быть достаточными для развития сосудистой неоплазии. Приводятся доказательства того, что белок ARF (alternative reading frame) и p53-сигнальный путь играют непосредственную причинно-следственную роль в подавлении образования сосудистых опухолей печени. В экспериментах на мышах показано, что при инактивации ARF происходит повышение частоты гемангиом и гемангиосарком, индуцированных канцерогеном. Эффект ингибирования сосудистых поражений зависит не только от гена *Arf*, но и от генетической линии мышей. У мышей с дефицитом Trp53 после воздействия уретана развивались сосудистые опухоли печени, что позволяет предположить, что ARF подавляет развитие гемангиосарком посредством p53-сигнального пути, который может представлять новую молекулярную мишень для терапии у пациентов с гемангиосаркомами [23].

**Опухоли толстой кишки.** Противоопухолевые эффекты ГК у мышей в группах, получавших ГК как после курса 1,2-ДМГ, так и при использовании ГК до стадии инициации канцерогеном, проявились статистически значимым снижением частоты всех новообразований толстой кишки и частоты злокачественных опухолей при этих двух схемах по сравнению с группой канцерогена (см. табл. 2). Наши данные согласуются с исследованиями других авторов в этом направлении. Было показано, что экстракты плодов жаботикабы, бразильского виноградного дерева (*Myrciaria cauliflora*), содержащие ГК и эллаговую кислоту, в экспериментах на 1,2-ДМГ-индуцированном канцерогенезе приводят к снижению частоты образования aberrантных очагов крипт (aberrant crypt foci), пренеопластических изменений эпителия кишечника [24]. В других экспериментах, в которых животные получали ГК на различных этапах химически индуцированного канцерогенеза, ее профилактический потенциал в отношении новообразований толстой кишки был ассоциирован с влиянием на перекисное окисление липидов и систему антиоксидантной защиты [25]. Развитие рака толстой кишки обусловлено нарушением экспрессии множества генов, в их числе ген *SRC*, продуктом которого является тирозинкиназа c-Src (proto-oncogene tyrosine-protein

kinase), активирующая сигнальные пути: PI3K (phosphoinositide 3-kinases)/АКТ (protein kinase B), MAPK (mitogen-activated protein kinase) и STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3). Показано, что у 80 % пациентов с колоректальным раком отмечается повышенная экспрессия гена *SRC*. На клеточных линиях рака толстой кишки HCT116 и HT29, а также в экспериментах на животных был уточнен механизм действия ГК, связанный с фосфорилированием *SRC* и *EGFR* (epidermal growth factor receptor). Результаты показали, что ГК подавляет пролиферацию клеток и способствует их апоптозу, повышая соотношения: каспаза-3/прокаспазы-3 и каспаза-9/прокаспазы-9. Одновременно ГК снижала уровень фосфорилированного (p)-*SRC*, p-*EGFR*, p-*АКТ* и p-*STAT3* [26].

**Опухоли репродуктивных органов.** В последнее время исследования эффективности ГК при лечении рака яичников вызывают большой интерес благодаря ее биодоступности, безопасности, меньшему количеству побочных эффектов и экономичности. В нашем исследовании при применении ГК после курса воздействия 1,2-ДМГ мы наблюдали значимое снижение частоты опухолей репродуктивных органов, по всей видимости, связанное со способностью ГК избирательно оказывать цитотоксическое действие на опухолевые клетки. При изучении другими авторами влияния ГК на клеточные линии рака яичников человека SKOV-3 и OVCAR-3 показано, что противоопухолевое действие ГК проявилось снижением жизнеспособности этих клеток, остановкой клеточного цикла и индукцией апоптоза из-за выработки АФК ( $p \leq 0,05$ ). На другой модели при перитуморальном введении 50 мг/кг ГК в течение 28 дней мышам *Nu/Nu*, ксенотрансплантированным клетками SKOV-3, было обнаружено 50 % ингибирование роста опухолей, получавших ГК [27]. При исследовании молекулярных механизмов ГК в отношении ингибирования экспрессии VEGF и активности ангиогенеза *in vitro* ГК проявила антиангиогенное действие на клетки рака яичников через сигнальный путь PTEN/АКТ/HIF-1 $\alpha$ /VEGF. Наряду с этим ГК, избирательно подавляя рост раковых клеток, не влияла на нормальные клетки яичников IOSE 364. Эти результаты указывают на высокий потенциал ГК в профилактике рака яичников, поскольку терапевтическое действие ГК хорошо переносится нормальными клетками яичников [28].

Галловая кислота проявляла цитотоксическое действие также в отношении клеток рака шейки матки HeLa путем снижения активности сигнальных путей *EGFR*, Akt/p-Akt и Erk (extracellular signal-regulated kinase)/p-Erk, активации каспаз и расщепления поли(АДФ-рибозо)полимеразы, а также остановки клеточного цикла [29].

Сравнительный анализ количества животных с опухолями легких в группах, получавших ГК как до курса введения 1,2-ДМГ, так и после него, не показал отличий в их частоте в зависимости от времени применения ГК, мы наблюдали только некоторую тенденцию к снижению частоты аденокарцином от 18,5 % в 3-й группе (ДМГ) до 11 и 11,8 % в 4-й и 5-й группах соответственно.

Модель 1,2-ДМГ канцерогенеза, примененная нами для исследования влияния ГК на эндогенный биосинтез стабильных метаболитов аэробного окисления NO–NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (по выделению NO<sub>2</sub><sup>-</sup> с суточной мочой), позволила показать то, что в группах, получавших ГК на фоне канцерогена, значительно снижено образование NO<sub>2</sub><sup>-</sup> по сравнению с таковым у животных, получавших только 1,2-ДМГ. Известно, что при канцерогенезе активность провоспалительных ферментов циклооксигеназы-2 и iNOS значительно возрастает [10]. Повышенная экспрессия iNOS, вызванная активацией протоонкогена K-ras в присутствии воспалительных стимулов, является ранним и значимым событием канцерогенеза. Можно предположить, что один из механизмов антиканцерогенного действия ГК – ее способность ингибировать синтез метаболитов.

Таким образом, в длительных экспериментах на мышах при использовании дозы канцерогена 3,6 мг/кг были индуцированы опухоли различных локализаций, частота которых была значительно снижена при применении ГК по сравнению с высокой частотой опухолей в группе с 1,2-ДМГ. Опыты показали, что при поступлении ГК в организм животных после стадии инициации, вызванной 1,2-ДМГ, она проявила выраженную антиканцерогенную активность по отношению к опухолям печени, толстой кишки и репродуктивных органов, что подтверждается статистически значимым снижением их множественности. ГК подавляет эндогенное образование реакционных метаболитов NO – нитритов, тем самым уменьшая негативные последствия нитрозативного стресса, часто регистрируемого при развитии опухолей. Увеличение числа животных с доброкачественными образованиями среди здоровых мышшей-самок под влиянием длительного поступления ГК требует дальнейших углубленных исследований в хронических опытах.

### Заключение

На модели 1,2-ДМГ-индуцированного канцерогенеза показано антиканцерогенное действие ГК. Проявление этого эффекта зависело от того, на каком этапе канцерогенеза ГК поступала в организм мышшей. Применение ГК за 3 нед до индукции опухолей канцерогеном вызывало статистически значимое снижение доброкачественных полипов и аденокарцином

толстой кишки. При воздействии ГК после курса введения 1,2-ДМГ ингибирующий эффект ГК проявлялся сильнее и вызывал статистически значимое торможение развития добро- и злокачественных опухолей толстой кишки, печени, репродуктивных органов (матки, яичников и маточных труб). При действии ГК на стадиях промоции и прогрессии отмечали уменьшение показателя множественности всех опухолей (доброкачественных + злокачественных), а также злокачественных в 2,6 и 2,7 раза соответственно ( $p < 0,01$ ). Определение эндогенного син-

теза реакционных метаболитов NO (по выделению  $\text{NO}_2^-$  с суточной мочой) показало снижение образования  $\text{NO}_2^-$  у мышей с опухолями, получавших ГК. Подавление избыточного эндогенного образования реакционного NO и его метаболитов под влиянием ГК может вносить свой вклад в механизм ингибирования развития химически индуцированных опухолей. Полученные данные позволяют расширить возможности использования ГК в качестве химиопрофилактического препарата, а также перспективного соединения для применения в онкологической практике.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Mattiuzzi G., Lippi G. Current cancer epidemiology. *J Epidemiol Glob Health* 2019;9(4):2019–222. DOI: 10.2991/jegh.k.191008.001
- Kahkeshani N., Farzai F., Fotouhi M. et al. Pharmacological effects of gallic acid in health and diseases: A mechanistic review. *Iran J Basic Med Sci* 2019;22(3):225–37. DOI: 10.22038/ijbms.2019.3280
- Jiang Y., Pei J., Zheng Y. et al. Gallic acid: a potential anti-cancer agent. *Chin J Integr Med* 2022;28(7):661–71. DOI: 10.1007/s11655-021-3345-2
- Hassani S., Ghanbari F., Lotfi M. et al. How gallic acid regulates molecular signaling: role in cancer drug resistance. *Med Oncol* 2023;40(11):308. DOI: 10.1007/s12032-023-02178
- Kirsanov K., Fetisov T., Lesovaya E., Yagubovskaya M.G. Prevention of colorectal carcinogenesis by DNA-binding small-molecule curaxin CBL0137 involves suppression of Wnt signaling. *Cancer Prev Res (Phila)* 2020;13(1):53–64. DOI: 10.1158/1940-6207
- Turusov V.S., Lanko N.S., Krutovskikh V.A., Parfenov Y.D. Strain differences in susceptibility of female mice to 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis* 1982;3(6):603–8. DOI: 10.1093/carcin/3.6.603
- Venkatachalam K., Vinayagam R., Isa N.M., Ponnaiyan R. Biochemical and molecular aspects of 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis: a review. *Toxicol Res (Camb)* 2020;9(1):2–18. DOI: 10.1093/toxres/taaa00431-35
- Nascimento-Gonsalves E., Mendes B.A.L., Silva-Reis R. et al. Animal models of colorectal cancer: from spontaneous to genetically engineered models and their applications. *Vet Sci* 2021;5(8):59. DOI: 10.3390/vetsci8040059
- Mittal A., Vashistha K., Das D.K. Free radical scavenging activity of gallic acid toward various reactive oxygen, nitrogen, and sulfur species: a DFT approach. *Free Radical Res* 2023;57(2):81–90. DOI: 10.1080/107157622023.2197556
- Дерягина В.П., Рыжова Н.И., Кривошеева Л.В. и др. Экспрессия iNOS и биосинтез метаболитов оксида азота при росте опухолей различного гистогенеза. *Успехи молекулярной онкологии* 2016;3:73–80. DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-73-80  
Deryagina V.P., Ryzhova N.I., Krivosheeva L.V. et al. iNOS expression and biosynthesis in the course of tumor growth of different histogenesis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2016;3:73–80. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-73-80
- Дерягина В.П., Рыжова Н.И., Савлущинская Л.А., Кирсанов К.И. Роль оксида азота и эндотелиальной NO-синтазы в канцерогенезе. *Успехи молекулярной онкологии* 2021;8(2):29–39. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-2-29-39
- Deryagina V.P., Ryzhova N.I., Savluchinskaya L.A., Kirsanov K.I. Role of nitric oxide and endothelial NO synthase in carcinogenesis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2021;8(2):29–39. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-2-29-39
- Turusov V.S. Pathology of tumors in laboratory animal. Vol. II: Tumors in the mouse. In: *IARC*. 1<sup>st</sup> Ed. Lyon, 1979. 655 p.
- Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assay based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;85(1–2): 51–70. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.07.054
- Gatt J., Krewski N., Lee P.N. Statistical methods in cancer research. *IARC Publ* 1996;3:1–207.
- Koh Y.C., Ho C.T., Pan M.H. Recent advances in cancer chemoprevention with phytochemicals. *J Food Drug Anal* 2020;28(1):14–37. DOI: 10.1016/j.jfda.2019.11.001
- Clark J., You M. Chemoprevention of lung cancer by tea. *Mol Nutr Food Res* 2006;50(2):144–51. DOI: 10.1002/mnfr.200500135
- Yang C.S., Wang H., Lu G., Picinich S.C. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat Rev Cancer* 2009;9(6):429–39. DOI: 10.1038/nrc2641
- Yamane T., Takahashi T., Kuwata K. et al. Inhibition of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced carcinogenesis by (–)-epigallocatechin gallate in the rat glandular stomach. *Cancer Res* 1995;55(10):2081–4. PMID: 7743506
- Ju J., Hong J., Zhou J.N. et al. Inhibition of Intestinal tumorigenesis in Apc<sup>min/+</sup> mice by (–)-epigallocatechin-3-gallate, the major catechin in green tea. *Cancer Res* 2005;65(22):10623–31. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1949
- Jagan S., Ramakrishnan G., Anandakumar P. et al. Antiproliferative potential of gallic acid against diethylnitrosamine-induced rat hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biochem* 2008;319(1-2):51–9. DOI: 10.1007/s11010-008-9876-4
- Sun G., Zhang S., Xie Y. et al. Gallic acid as a selective anticancer agent that induces apoptosis in SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Lett* 2016;11(1):150–8. DOI: 10.3892/ol.2015.3845
- Rankin E.B., Rha J., Unger T.L. et al. Hypoxia-inducible factor-2 regulates vascular tumorigenesis in mice. *Oncogene* 2008;27(40):5354–8. DOI: 10.1038/onc.2008.160
- Busch S.E., Gurley K.E., Moser R.D., Kemp C.J. ARF suppresses hepatic vascular neoplasia in a carcinogen-exposed murine model. *J Pathol* 2012;227(3):298–305. DOI: 10.1002/path.4024
- Ardanawari K., Lowisia W., Soedarini B. et al. Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) fruit extract suppressed aberrant crypt

- formation in 1,2-dimethylhydrazine-induced rats. *Plant Foods Hum Nutr* 2023;78(2):286–91. DOI: 10.1007/s11130-023-01051-z
25. Giftson J.S., Jayanthi S., Nalini N. Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Invest New Drugs* 2010;28(3):251–9. DOI: 10.1007/s10637-009-9241-9
26. Lin X., Wang G., Liu P. et al. Gallic acid suppresses colon cancer proliferation by inhibiting SRC and EGFR phosphorylation. *Exp Ther Med* 2021;21(6):638. DOI: 10.3892/etm.2021.10070
27. Varela-Rodríguez L., Sánchez-Ramírez B., Hernández-Ramírez V.I. et al. Effect of gallic acid and myricetin on ovarian cancer models: a possible alternative antitumoral treatment. *BMC Complement Med Ther* 2020;20(1):110. DOI: 10.1186/s12906-020-02900-z
28. He Z., Chen A.C., Rojanasakul Y. et al. Gallic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenic effects via the PTEN/AKT/HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway in ovarian cancer cells. *Oncol Rep* 2016;35(1):291–7. DOI: 10.3892/or.2015.4354
29. Keyvani-Ghamsari S., Rahimi M., Khorsandi K. An update on the potential mechanism of gallic acid as an antibacterial and anticancer agent. *Food Sci Nutr* 2023;11(10):5856–72. DOI: 10.1002/fsn3.3615

#### Вклад авторов

Н.И. Рыжова: анализ экспериментального материала, интерпретация данных, редактирование текста публикации;  
В.П. Дерягина: планирование исследований, подготовка и анализ текста публикации;  
Л.А. Савлучинская: обсуждение результатов, подготовка и редактирование текста публикации;  
И.С. Голубева: редактирование текста рукописи, работа со списком литературы;  
Л.В. Кривошеева: экспериментальная работа, редактирование текста рукописи и иллюстративного материала;  
К.И. Кирсанов: редактирование, подготовка текста к публикации, утверждение заключительного текста статьи.  
Все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку статьи и утвердили окончательный вариант, одобренный к публикации.

#### Author's contributions

N.I. Ryzhova: analysis of experimental material, interpretation of data, editing of the publication text;  
V.P. Deryagina: research planning, preparation and analysis of publication text;  
L.A. Savluchinskaya: discussion of results, preparation and editing of publication text;  
I.S. Golubeva: editing the text of the manuscript, working with the bibliography;  
L.V. Krivosheeva: experimental work, editing of manuscript text and illustrative material;  
K.I. Kirsanov: editing, preparing text for publication, approval of the final text of the article.

All authors contributed equally to the preparation of the article and approved the final version accepted for publication.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

Н.И. Рыжова / N.I. Ryzhova: <https://orcid.org/0000-0002-4224-6303>  
В.П. Дерягина / V.P. Deryagina: <https://orcid.org/0000-0002-3204-3481>  
Л.А. Савлучинская / L.A. Savluchinskaya: <https://orcid.org/0009-0001-1577-6472>  
И.С. Голубева / I.S. Golubeva: <https://orcid.org/0000-0002-7263-7444>  
Л.В. Кривошеева / L.V. Krivosheeva: <https://orcid.org/0009-0008-0418-3971>  
К.И. Кирсанов / K.I. Kirsanov: <https://orcid.org/0000-0002-8599-6833>

**Соблюдение правил биоэтики.** Все исследования были выполнены в соответствии с рекомендациями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях. Согласно заключению комиссии по биоэтике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» настоящее исследование не противоречит требованиям этической экспертизы (выписка из протокола комиссии № 08-b-24 от 22.10.2024).

**Compliance with principles of bioethics.** All the experiments were performed according to the recommendations of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22.09.2010 on the protection of animals used for scientific purposes. According to the conclusion of the Bioethics Commission of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, this study does not contradict the requirements of ethical review (extract from the Commission's protocol No. 08-b-24 dated 22.10.2024).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного бюджетного финансирования.

**Funding.** The work was carried out using state budget funding.

Статья поступила: 04.06.2025. Принята к публикации: 01.10.2025. Опубликовано онлайн: 10.12.2025.

Article submitted: 04.06.2025. Accepted for publication: 01.10.2025. Published online: 10.12.2025.

# Первичная оценка противоопухолевой активности нового производного 3-гидроксихиназолина – потенциального индуктора ферроптоза

Е.В. Санарова<sup>1</sup>, Л.М. Борисова<sup>1</sup>, М.П. Киселева<sup>1</sup>, Л.Л. Николаева<sup>1,2</sup>, Д.В. Гусев<sup>1</sup>, В.Н. Осипов<sup>1</sup>, О.Л. Орлова<sup>1</sup>, И.С. Голубева<sup>1</sup>, А.В. Ланцова<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119048 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

**Контакты:** Екатерина Викторовна Санарова [sanarova8686@mail.ru](mailto:sanarova8686@mail.ru)

**Введение.** Ферроптоз – неапоптотическая железозависимая форма регулируемой клеточной гибели, при которой в клетке накапливаются продукты перекисного окисления фосфолипидов мембран, открыта сравнительно недавно. Многочисленные научные публикации за последние годы свидетельствуют о том, что ферроптоз может приводить к гибели опухолевых клеток, выживших после химиотерапии. Именно поэтому ферроптоз как альтернативный путь гибели клеток вызывает надежду на новые возможности для развития и совершенствования современной противоопухолевой лекарственной терапии. Производные 3-гидроксихиназолина как индукторы ферроптоза представляют собой перспективные фармакологические вещества с выраженной ферроптотической активностью.

**Цель исследования** – первичная оценка противоопухолевой активности нового отечественного производного 3-гидроксихиназолина OVF-009 – потенциального индуктора ферроптоза на моделях опухолевого роста мышей при двух путях введения (внутрибрюшинном и пероральном).

**Материалы и методы.** Оригинальная субстанция OVF-009, вспомогательные вещества (Kolliphor ELP, этанол 95 %, Kollidon 17 PF, гидроксид натрия, фосфатный буфер и др.); технологические методы; иммунокомпетентные мыши, опухолевые модели (эпидермоидная карцинома легкого Lewis, меланома B-16, рак шейки матки РШМ-5, аденокарцинома молочной железы Ca-755); биологические методы, описанные в методических рекомендациях по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. Противоопухолевый эффект оценивали по торможению роста опухолей (ТРО) животных, получавших OVF-009, по сравнению с животными контрольной группы.

**Результаты.** В ходе технологического этапа работы получена пероральная лекарственная форма OVF-009 на основе кукурузного масла. Для внутрибрюшинного введения использовали ранее разработанный раствор на основе гидрогенизированного касторового масла. В результате проведенных экспериментов на опухолевых моделях мышей показано, что при внутрибрюшинном введении максимальный противоопухолевый эффект на меланоме B-16 составил 75 % ТРО на 8-й день после окончания введения, на эпидермоидной карциноме легкого Lewis получен высокий, но кратковременный эффект ТРО = 84 % в 1-й день. При пероральном введении наилучшие результаты получены на Ca-755 и РШМ-5: на Ca-755 показан значимый противоопухолевый эффект с ТРО = 76–77 % ( $p < 0,05$ ) до 8-го дня после окончания введения; на РШМ-5 отмечено ТРО = 73–68 % ( $p < 0,05$ ) с 8-го по 16-й день наблюдения.

**Заключение.** Полученные результаты изучения противоопухолевой активности OVF-009 на опухолевых моделях мышей свидетельствуют о перспективности продолжения углубленного доклинического изучения данной оригинальной субстанции.

**Ключевые слова:** производное хиназолина, ферроптоз, противоопухолевая активность, лекарственная форма, путь введения

**Для цитирования:** Санарова Е.В., Борисова Л.М., Киселева М.П. и др. Первичная оценка противоопухолевой активности нового производного 3-гидроксихиназолина – потенциального индуктора ферроптоза. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(4):56–63.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-56-63>

## Primary evaluation of a new 3-hydroxyquinazoline derivative initial – a potential inducer of ferroptosis antitumour activity

Ekaterina V. Sanarova<sup>1</sup>, Larisa M. Borisova<sup>1</sup>, Marina P. Kiseleva<sup>1</sup>, Ludmila L. Nikolaeva<sup>1,2</sup>, Dmitriy V. Gusev<sup>1</sup>, Vasily N. Osipov<sup>1</sup>, Olga L. Orlova<sup>1</sup>, Irina S. Golubeva<sup>1</sup>, Anna V. Lantsova<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenovskiy University), Ministry of Health of Russia; build. 2, 8 Trubetskaya St., 119048 Moscow, Russia

**Contacts:** Ekaterina Viktorovna Sanarova [sanarova8686@mail.ru](mailto:sanarova8686@mail.ru)

**Background.** Ferroptosis, a non-apoptotic, iron-dependent form of regulated cell death in which membrane phospholipid peroxidation products accumulate within the cell, was discovered relatively recently. Numerous scientific publications in recent years indicate that ferroptosis can lead to the tumor cells death that survive chemotherapy. Therefore, ferroptosis as an alternative pathway for cell death raises hope for new opportunities for the modern anticancer drug therapy development and improvement. 3-Hydroxyquinazoline derivatives as ferroptosis inducers are promising pharmacological substances with pronounced ferroptotic activity.

**Aim.** To conduct a preliminary assessment of the new domestic derivative of 3-hydroxyquinazoline (OVF-009), antitumor activity, a potential ferroptosis inducer, in mouse tumor growth models administered via two routes of administration (intraperitoneal and oral).

**Materials and methods.** Original substance OVF-009, excipients (Kolliphor ELP, ethanol 95 %, Kollidon 17 PF, sodium hydroxide, phosphate buffer, etc.); technological methods; immunocompetent mice, tumor models (Lewis lung epidermoid carcinoma, melanoma B-16, cervical cancer CC-5, breast adenocarcinoma Ca-755); biological methods described in the guidelines for drugs antitumor activity preclinical studies. The antitumor effect was assessed by tumor growth inhibition (TGI) of animals treated with OVF-009, compared with animals in the control group.

**Results.** During the technological stage of the work, an OVF-009 oral dosage form based on corn oil was obtained. For intraperitoneal administration, a previously developed solution based on hydrogenated castor oil was used. The result of the experiments on mice tumor models showed the maximum antitumor effect on melanoma B-16 of 75 % TGI on the 8<sup>th</sup> day after the end of administration, with Lewis lung epidermoid carcinoma, a high but short-term effect of TGI = 84 % on the 1<sup>st</sup> day with intraperitoneal administration. With per os administration, the best results were obtained with Ca-755 and CC-5: with Ca-755, a significant antitumor effect was shown with TGI = 76–77 % ( $p < 0.05$ ) up to the 8<sup>th</sup> day after the end of administration; with CC-5, TGI = 73–68 % ( $p < 0.05$ ) was noted from the 8<sup>th</sup> to the 16<sup>th</sup> day of observation.

**Conclusion.** The obtained results on the OVF-009 antitumor activity in mouse tumor models indicate the promise of this original substance continuing in-depth preclinical studies.

**Keywords:** quinazoline derivative, ferroptosis, antitumour activity, dosage form, route of administration

**For citation:** Sanarova E.V., Borisova L.M., Kiseleva M.P. et al. Primary evaluation of a new 3-hydroxyquinazoline derivative initial – a potential inducer of ferroptosis antitumour activity. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(4):56–63. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-56-63>

### Введение

Рак является одной из ведущих причин смертности в мире и представляет огромную угрозу здоровью человечества [1]. Согласно отчету Минздрава России за 2023 г. заболеваемость злокачественными опухолями увеличилась на 7,6 % по отношению к таковому показателю 2022 г. По данным Ассоциации онкологов России, в 2023 г. в Российской Федерации выявлены рекордные за все время 674 587 случаев злокачественных новообразований [2]. Эти показатели неутешительны и заставляют ученых, работающих в области повышения эффективности терапии рака, искать новые пути решения этой глобальной проблемы.

Преднамеренная индукция одного из видов гибели опухолевых клеток является ключевым компо-

нентом современного лечения рака. В соответствии с отличительными морфологическими особенностями механизмы гибели клеток обычно делят на 3 основные категории: апоптоз, аутофагия и некроз. В настоящее время традиционные стратегии противоопухолевой терапии, включая лучевую терапию и химиотерапию, в большей степени направлены на индуцирование апоптоза опухолевых клеток. Однако эти неспецифические методы лечения не только убивают раковые клетки, но и повреждают нормальные, что приводит к серьезным побочным реакциям терапии. Более того, многие опухолевые клетки проявляют внутреннюю лекарственную устойчивость или становятся невосприимчивыми после длительной химиотерапии. Недавние исследования

продемонстрировали: опухолевые клетки, невосприимчивые к традиционным методам лечения, сохраняют или приобретают чувствительность к ферроптозу, и это позволяет надеяться на то, что ферроптоз может быть многообещающей мишенью для терапии рака [3].

Впервые о ферроптозе как о типе железозависимой программируемой гибели клетки сообщили в 2012 г. после его открытия исследователями Колумбийского университета (США) [4]. Ферроптоз обусловлен железозависимым перекисным окислением фосфолипидов мембран и морфологически, биохимически и иммунологически отличается от традиционных путей клеточной гибели [5]. Клетки, подвергающиеся ферроптозу, имеют сморщенные митохондрии, уменьшенные или отсутствующие митохондриальные кристы, а также разрывы плазматической и внешней митохондриальной мембран, ядро остается целым (рис. 1). С точки зрения биохимических характеристик перегрузка окислительно-восстановительным действием железа, перекисное окисление липидов и дефектное восстановление перекисью липидов рассматривают как 3 основных признака ферроптоза [6]. Повышенный уровень железа способствует выработке активных форм кислорода в клетках, инициируя реакцию Фентона, которая, в свою очередь, приводит к ферроптозу в результате окислительного повреждения клеток [7].

Применение лекарственных средств, способных индуцировать ферроптоз в опухолевых клетках, является инновационной стратегией лечения опухолей. Индукторы ферроптоза, такие как эрастин, сульфа-

салазин, RSL3 и др., продемонстрировали эффективность в ингибировании роста опухоли на экспериментальных моделях животных [8]. Примечательно, что некоторые индукторы ферроптоза, включая сульфасалазин, сорафениб, были синтезированы и изучены до обнаружения ферроптоза и одобрены Управлением по контролю пищевых продуктов и лекарств США для клинического применения для других мишеней. Производное хиназолина эрастин (рис. 2, б) в настоящее время является эталонным веществом, применяемым в научных исследованиях для индукции ферроптоза и оценки его уровня в различных по морфологии клетках и тканях [9].

Другая перспективная стратегия предполагает сочетание индукции ферроптоза с существующими методами лечения опухоли, такими как лучевая терапия, фотодинамическая терапия и химиотерапия, при этом индукторы ферроптоза повышают чувствительность опухоли к этим методам лечения [10].

Производные хиназолина представляют собой обширный класс органических соединений. В зависимости от числа, природы и места присоединения заместителей к хиназолиновому ядру реализуются разные механизмы биологического действия, которые обеспечивают широкий спектр биологических свойств, таких как противоопухолевая, противовоспалительная, противовирусная и гипотензивная активность. Недавно опубликованы данные о способности производных 3-гидроксихиназолина индуцировать ферроптоз и вызывать гибель резистентных клеток рака молочной железы [11]. Это указывает на целесообразность синтеза новых соединений на

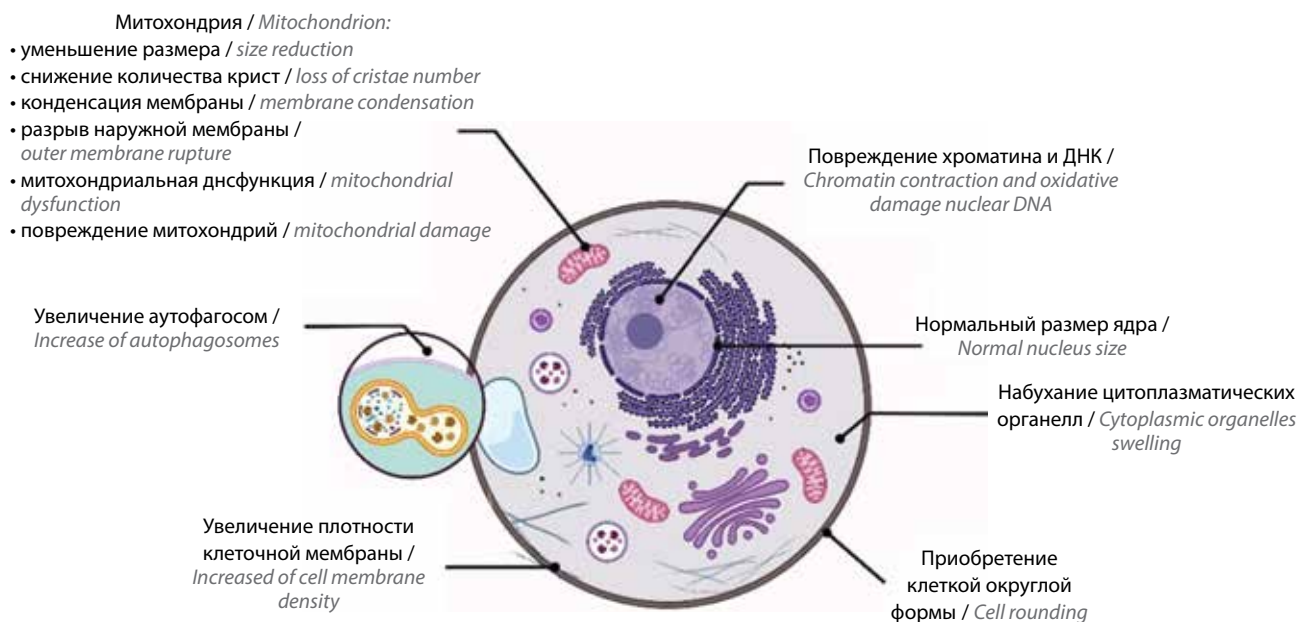


Рис. 1. Структурные и морфологические изменения в клетке при ферроптозе [5]

Fig. 1. Structural and morphological changes in the cell during ferroptosis [5]

основе хиназолина и открывает возможности для повышения с их помощью эффективности противоопухолевой терапии.

В Научно-исследовательском институте экспериментальной диагностики и терапии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина разработан способ получения, проведен синтез ряда новых производных хиназолина и активно изучаются их механизм действия и биологическая активность [12, 13]. На этапе исследований *in vitro* получены многообещающие данные для соединения OVF-009 – производного 3-гидроксихиназолина. Доказано, что это соединение, так же как эрастин, вызывает гибель клеток меланомы Mel Z неапоптотическим путем, поскольку нет характерных для апоптоза морфологических признаков – конденсации ядра и фрагментации ДНК. Вторым подтверждением неапоптотической гибели клетки является индуцированная OVF-009 гибель клеток в присутствии панкаспазного ингибитора апоптоза zVAD-fmk. На гибель клеток меланомы Mel Z, индуцированной соединением OVF-009, не оказывало влияния присутствие ингибитора аутофагии – хлорокина. Однако наличие дефероксамина, хелатора железа, практически полностью блокировало гибель клеток меланомы после обработки соединением OVF-009. Аналогичная закономерность наблюдалась и для клеток рака толстой кишки HCT-116. Таким образом, все изложенное подтверждает, что OVF-009 индуцирует в клетках меланомы Mel Z и рака толстой кишки HCT-116 ферроптоз [12].

В клетках меланомы Mel Z и рака толстой кишки HCT-116 также провели оценку уровня перекисного окисления липидов, вызванного OVF-009 в сравнении с эрастином с помощью флуорофора C11-BODIPY (Sigma, США). Уровень перекисного окисления липидов, индуцируемого 10 мкМ OVF-009, превышал уровень перекисного окисления липидов, индуцированного эрастином на  $22 \pm 2$  и  $30 \pm 2$  % в клетках Mel Z и в клетках HCT-116 соответственно. Полученные результаты позволили говорить о перспективности разработки модели лекарственной формы для данного вещества, обладающего более выраженной ферроптотической активностью, чем эрастин [12].

**Цель исследования** – первичная оценка противоопухолевой активности нового отечественного производного 3-гидроксихиназолина OVF-009 – потенциального индуктора ферроптоза на моделях опухолевого роста мышей при двух путях введения (внутрибрюшинном и пероральном).

## Материалы и методы

### Объект исследования

Оригинальное соединение OVF-009 – бензил 2-((2-(3,5-диметил-1*H*-пиразол-1-ил)-6-хлор-4-оксохиназолин-3(4*H*-ил)окси) ацетат синтезировано

в лаборатории химического синтеза НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Данное вещество, так же как и эрастин, нерастворимо в воде, однако обладает растворимостью в маслах и диметилсульфоксиде.

### Получение водных растворов OVF-009

#### для внутрибрюшинного введения

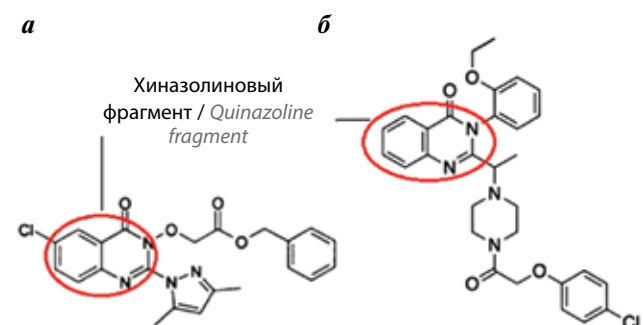
Метод подробно описан в работе Е.В. Санаровой и соавт. [14]. Следует отметить, что в настоящем исследовании использовали оптимизированный состав водного раствора, содержащего OVF-009 – 0,25 %, Kolliphor ELP (гидрогенизированное касторовое масло производства BASF, Германия) – 10 %, этанол («Константа-Фарм М», Россия) – 10 % и Kollidon 17 PF (BASF, Германия) – 16 %. Указанный раствор в дальнейшем удалось лиофилизировать и тем самым повысить его стабильность.

### Получение масляных растворов OVF-009

#### для перорального введения

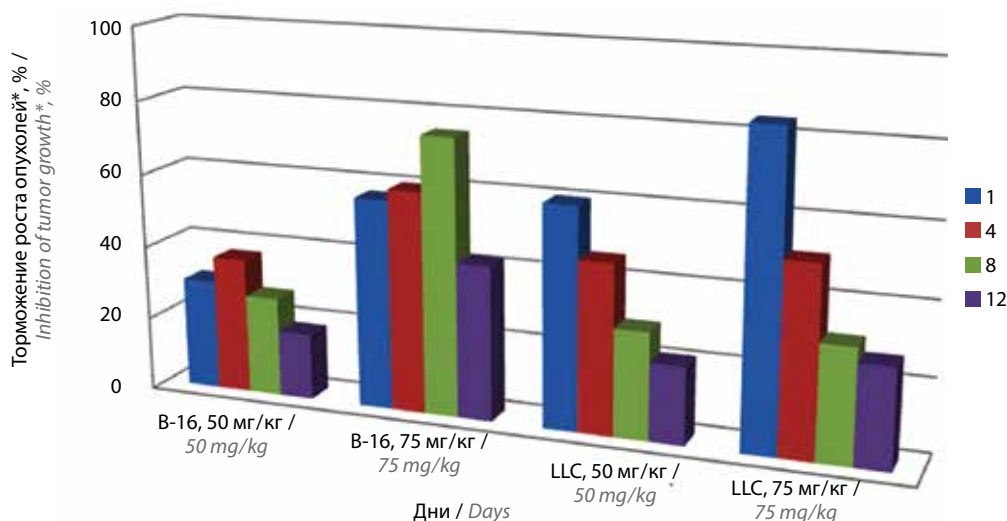
В связи с плохой растворимостью OVF-009 в воде и растворимостью в маслах были также приготовлены масляные растворы для перорального введения на основе кукурузного масла. В экспериментах использовали этот вид масла в связи с его хорошей растворяющей способностью и удовлетворительной переносимостью животными.

На аналитических весах Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия) в стеклянный стакан объемом 10 мл отвешивали субстанцию OVF-009 (из расчета концентрации в конечном растворе 5 мг/мл) и к отвешенной субстанции приливали рассчитанный объем кукурузного масла (Sigma-Aldrich (Merck), США), выдерживали 5–10 мин при комнатной температуре и нагревали до 60 °С, при наличии нерастворившихся частиц обрабатывали в ультразвуковой ванне Cole-Parmer 8853 Ultrasonic Cleaner (Cole-Parmer, США) до получения прозрачного раствора без видимого осадка.



**Рис. 2.** Структурная формула производного 3-гидроксихиназолина OVF-009 (а) и эрастина (б) – известного индуктора ферроптоза

Fig. 2. Structural formula of derivative of 3-hydroxyquinazoline OVF-009 (a) and erastin (b), a well-known inducer of ferroptosis



**Рис. 3.** Противоопухолевая эффективность раствора OVF-009 при 5-кратном внутривнутрибрюшинном введении мышам (\* $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой в рамках 1 опухолевой модели и 1 дозы, по дням после окончания введения модельного раствора)

**Fig. 3.** Antitumour efficacy of OVF-009 solution when administered fivefold intraperitoneally to mice ( $p < 0.05$  compared to the control group within one tumor model and one dose, by days after cessation of administration of the modeling solution)

### Исследования специфической противоопухолевой активности растворов OVF-009 *in vivo*

Эксперименты *in vivo* выполняли в соответствии с методическими рекомендациями [15]. Половозрелых мышей-самок гибридов F1 (C57Bl/6 × DBA/2) и CBA/Лас массой тела 20–22 г содержали в виварии при естественном освещении, на стандартном рационе питания и свободном доступе к воде [16].

Оценку противоопухолевой активности исследуемого соединения – индуктора ферроптоза – проводили на перевиваемых опухолях мышей: эпидермоидной карциноме легкого Lewis (LLC), меланоме B-16, аденокарциноме молочной железы Ca-755 и раке шейки матки РШМ-5. Штаммы опухолей получены из банка опухолевых штаммов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Штаммы поддерживали стандартными серийными перевивками на самках линии C57Bl/6 каждые 12–14 дней: LLC – внутримышечно, B-16 и Ca-755 – подкожно. РШМ-5 поддерживали на самках линейных мышей CBA/Лас каждые 19–20 дней подкожно. В опытах использованы 3–6-й пассажи *in vivo*. Трансплантацию опухолей в экспериментах выполняли по стандартной методике, принятой в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. LLC, B-16 и Ca-755 перевивали самкам гибридов F1 (C57Bl/6 × DBA/2), РШМ-5 перевивали самкам линии CBA/Лас. Для трансплантации опухолевую ткань измельчали ножницами до гомогенной консистенции, добавляли среду 199 («ПанЭко», Россия) до соотношения 1:10 и 0,5 мл (50 мг опухолевой массы) полученной суспензии вводили мышам подкожно в область правой подмышечной впадины [15]. Группы животных формировали с учетом получения статистически достоверных ре-

зультатов: контрольная группа состояла из 10 мышей, опытные группы – из 6 мышей.

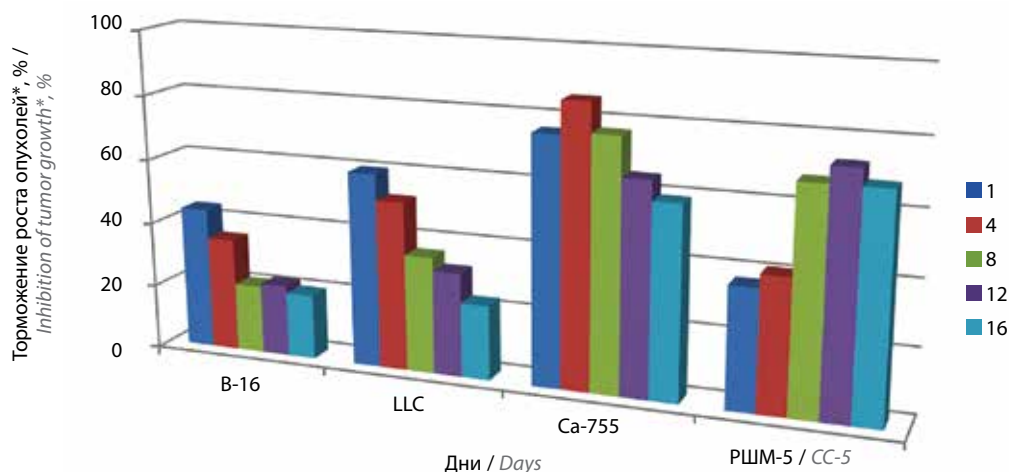
Субстанцию OVF-009 вводили мышам ежедневно в течение 5 дней с интервалом 24 ч в дозах 50 и 75 мг/кг внутривнутрибрюшинно и в дозе 150 мг/кг перорально (*per os*). Начало введения – через 48 ч после трансплантации опухоли.

Противоопухолевый эффект соединения оценивали по торможению роста опухоли (ТРО, %) у подопытных животных по сравнению с контрольными животными [15]. Минимальным критерием активности являлось ТРО  $\geq 50$  %. Эффективными считали дозы, вызывающие ТРО  $\geq 70$  % с сохранением значимого эффекта не менее 7 сут. Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием компьютерной программы Statistica 6.0. Различия между сравниваемыми группами считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Первичную оценку противоопухолевой активности труднорастворимой субстанции OVF-009 проводили при внутривнутрибрюшинном пути введения мышам с перевитыми опухолями – LLC и меланомой B-16, входящими в обязательный перечень к изучению спектра противоопухолевой активности.

Ранее нами были проведены расширенные технологические исследования, направленные на получение раствора субстанции OVF-009 с целью оценки ее противоопухолевой активности при проведении биологических экспериментов на животных [14]. Раствор на основе гидрогенизированного касторового масла, содержащий 2,5 мг/мл действующего вещества,



**Рис. 4.** Противоопухолевая эффективность масляного раствора OVF-009 при пероральном введении мышам в дозе 150 мг/кг в течение 5 дней (\* $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой в рамках одной опухолевой модели, по дням после окончания введения модельного раствора). LLC – эпидермоидная карцинома легкого Lewis; B-16 – меланома; РШМ-5 – рак шейки матки; Ca-755 – аденокарцинома молочной железы

**Fig. 4.** Antitumor efficacy of OVF-009 oil solution when administered orally to mice at a dose of 150 mg/kg for 5 days (\* $p < 0,05$  compared to the control group within one tumor model, by days after cessation of administration of the modeling solution). LLC – Lewis lung epidermoid carcinoma; B-16 – melanoma; CC-5 – cervical cancer; Ca-755 – breast adenocarcinoma

вводили мышам внутривентриально первоначально в дозе 50 мг/кг. В результате на меланоме B-16 не было получено значимого эффекта (максимальное ТРО на 4-й день после окончания введения составило 37 %), на LLC эффект был кратковременный, начиная с 60 % ТРО в 1-й день после окончания введения, к 8-му дню значение ТРО падало до 29 % (рис. 3). В следующем опыте на тех же опухолевых моделях при таком же пути введения терапевтическая доза была увеличена до 75 мг/кг. При этом максимальный эффект на меланоме B-16 составил 75 % ТРО на 8-й день после окончания введения, на опухоли LLC эффект был высоким, но кратковременным и составил 84 % ТРО только в 1-й день после окончания введения модельного раствора (см. рис. 3).

По имеющимся данным о физико-химических свойствах соединения OVF-009, оно достаточно хорошо растворимо в маслах, что позволило создать экспериментальную модель лекарственной формы для перорального введения в виде масляного раствора. Удалось получить истинный стабильный раствор с максимальной концентрацией действующего вещества 5,0 мг/мл. Исследование противоопухолевой активности масляного раствора OVF-009 проводили при 5-дневном введении *per os* в дозе 150 мг/кг (такая доза обеспечивала максимально возможный объем введения). В исследовании использовали те же перевитые мышам опухолевые модели LLC и B-16, что и при внутривентриальном введении. Уровень терапевтической эффективности при пероральном введении был сопоставим с таковым при внутривентриальном введении: ТРО на обеих опухолевых моделях

не превышало минимального критерия активности (рис. 4).

Дальнейшие исследования проведены на опухолевых моделях аденокарциномы молочной железы Ca-755 и РШМ-5 мышей (см. рис. 4). На Ca-755 получен значимый противоопухолевый эффект: ТРО составило 76–77 % ( $p < 0,05$  к контролю) с 1-го по 8-й день после окончания введения. На РШМ-5 эффективность ТРО составила 37–68 % ( $p < 0,05$ ) с 1-го по 8-й день после окончания введения модельного раствора, при продолжении эксперимента высокий уровень противоопухолевой активности сохранялся на уровне ТРО = 73–68 % ( $p < 0,05$ ) до 16-го дня после окончания введения модельного раствора.

### Заключение

Первичная оценка действия оригинального производного 3-гидроксикиназолина OVF-009 – индуктора ферроптоза в модельных растворах для перорального и парентерального применения – на перевиваемых опухолях мышей показала его противоопухолевую активность. OVF-009 в дозе 75 мг/кг при 5-кратном ежедневном внутривентриальном введении вызывал максимальный противоопухолевый эффект на меланоме B-16 на уровне 75 % ( $p < 0,05$ ) ТРО на 8-й день после окончания введения, на опухоли LLC – высокий, но кратковременный эффект с ТРО = 84 % в 1-й день после окончания введения модельного раствора. OVF-009 в модельном растворе для перорального применения при введении в течение 5 дней *per os* в дозе 150 мг/кг показал на Ca-755 высокий противоопухолевый

эффект с ТРО = 76–77 % ( $p < 0,05$ ) до 8-го дня после окончания введения. На РПМ-5 получен отсроченный эффект ТРО = 73–68 % ( $p < 0,05$ ) с 8-го по 16-й день после окончания введения модельного раствора.

Проведенная серия экспериментов на опухолевых моделях, осуществленных как при внутрибрюшинном, так и при пероральном введении растворов OVF-009, обобщила данные об эффективных дозах соединения и чувствительности различных опухолевых моделей.

Представленные в мировой научной литературе сведения в области поиска эффективных противоопухолевых лекарственных средств, обладающих уникальным механизмом действия — ферроптозом, открывают перспективы для продолжения исследований. Полученные экспериментальные данные по оценке первичной противоопухолевой активности нового отечественного производного 3-гидроксихиназолина OVF-009 свидетельствуют о значительном потенциале его дальнейшего изучения.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* 2022;72(1):7–33. DOI: 10.3322/caac.21708
2. Злокачественные новообразования в России в 2023 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024. 276 с. Malignant neoplasms in Russia in 2023 (morbidity and mortality). Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, A.O. Shachzadova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMITS radiologii” Minzdrava Rossii, 2024. 276 p. (In Russ.).
3. Zhang C., Liu X., Jin S. et al. Ferroptosis in cancer therapy: a novel approach to reversing drug resistance. *Mol Cancer* 2022;21(1):47. DOI: 10.1186/s12943-022-01530-y
4. Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R. et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012;149(5):1060–72. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042
5. Pourhabib Mamaghani M., Mousavikia S.N., Azimian H. Ferroptosis in cancer: mechanisms, therapeutic strategies, and clinical implications. *Pathol Res Pract* 2025;269:155907. DOI: 10.1016/j.prp.2025.155907
6. Zhou Q., Meng Y., Li D. et al. Ferroptosis in cancer: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Signal Transduct Target Ther* 2024;9(1):55. DOI: 10.1038/s41392-024-01769-5
7. Tang D., Kroemer G. Ferroptosis. *Curr Biol* 2020;30(21):R1292–7. DOI: 10.1016/j.cub.2020.09.068
8. Борисова Л.М., Голубева И.С., Киселева М.П. Молекулярные характеристики ферроптоза. *Сибирский медицинский журнал* 2019;158(3):11–6. DOI: 10.34673/ismu.2020.49.16.002 Borisova L.M., Golubeva I.S., Kiseleva M.P. Molecular determinants of ferroptosis. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal* 2019;3:11–6. (In Russ.). DOI: 10.34673/ismu.2020.49.16.002
9. Санарова Е.В., Ланцова А.В., Николаева Л.Л. и др. Индукторы ферроптоза – эрастин и его аналоги (обзор). Разработка и регистрация лекарственных средств 2024;13(2):77–83. DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-2-1786 Sanarova E.V., Lantsova A.V., Nikolaeva L.L. et al. Ferroptosis inducers – erastin and analogues (review). *Razrabotka y registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development & Registration* 2024;13(2):77–83. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-2-1786
10. Kojima Y., Tanaka M., Sasaki M. et al. Induction of ferroptosis by photodynamic therapy and enhancement of antitumor effect with ferroptosis inducers. *J Gastroenterol* 2024;59(2):81–94. DOI: 10.1007/s00535-023-02054-y
11. Борисова Л.М., Осипов В.Н., Голубева И.С. и др. Производные 3-гидроксихиназолина, аналоги эрастина, индуцируют ферроптоз в клетках карциномы молочной железы. *Успехи молекулярной онкологии* 2022;9(1):48–56. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-48-56 Borisova L.M., Osipov V.N., Golubeva I.S. et al. 3-Hydroxyquinazoline derivatives, analogues of erastin, induced ferroptosis in breast cancer cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2022;9(1):48–56. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-48-56
12. Вартанян А.А., Осипов В.Н., Хоченков Д.А. и др. Производные хиназолина, индуцирующие ферроптоз в метастатических клетках меланомы и рака толстой кишки. Патент на изобретение РФ № 2722308 C1, 28.05.2020. URL: <https://patenton.ru/patent/RU2722308C1?ysclid=mi1ldb7f7mh307293778> Vartanyan A.A., Osipov V.N., Khochenkov D.A. et al. Quinazoline derivatives inducing ferroptosis in metastatic melanoma cells and colon cancer. Patent of Invention RU 2722308C1, 28.05.2020. URL: <https://patenton.ru/patent/RU2722308C1?ysclid=mi1ldb7f7mh307293778>. (In Russ.).
13. Борисова Л.М., Осипов В.Н., Гусев Д.В. и др. Производное 3-гидроксихиназолина, аналог эрастина, индуцирует ферроптоз в метастатических клетках меланомы. *Российский биотерапевтический журнал* 2021;20(1):67–73. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-1-67-73 Borisova L.M., Osipov V.N., Gusev D.V. et al. 3-hydroxyquinazoline derivative, an analogue of erastin, induces ferroptosis in metastatic melanoma cells. *Rossiiskij bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2021;20(1):67–73. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-1-67-73
14. Санарова Е.В., Ланцова А.В., Николаева Л.Л. и др. Солюбилизация производного 3-гидроксихиназолина, обладающего противоопухолевой активностью. *Российский биотерапевтический журнал* 2023;22(4):60–7. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-4-60-67 Sanarova E.V., Lantsova A.V., Nikolaeva L.L. et al. Solubilization of 3-hydroxyquinazoline derivative with antitumor activity. *Rossiiskij bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2023;22(4):60–7. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-4-60-67
15. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1.* М.: Гриф и К., 2012. С. 642–657. Treshchalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K. et al. Methodical recommendations for the preclinical study of the

antitumor activity of drugs. In: Guidance on preclinical studies of drugs. Part 1. Moscow: Grif and K., 2012. P. 642–657. (In Russ.).  
16. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Пер. с англ. под ред. И.В. Белозерцевой, Д.В. Бли-

нова, М.С. Красильщиковой. 8-е изд. М.: ИРБИС, 2017. 336 с.  
Guide for the care and use of laboratory animals. Translated from English by I.V. Belozertseva, D.V. Blinov, M.S. Krasilshchikova. 8<sup>th</sup> ed. Moscow: IRBIS, 2017. 336 p. (In Russ.).

#### Вклад авторов

Е.В. Санарова, Л.М. Борисова: разработка дизайна исследования, проведение экспериментов, анализ полученных данных, написание текста статьи;

М.П. Киселева, Л.Л. Николаева, О.Л. Орлова, А.В. Ланцова: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, редактирование статьи;

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

И.С. Голубева: проведение экспериментов.

#### Author's contributions

E.V. Sanarova, L.M. Borisova: development of the research design, conducting the experiments, analysis of the obtained data, writing the text of the article;

M.P. Kiseleva, L.L. Nikolaeva, O.L. Orlova, A.V. Lantsova: review of publications on the topic of the article, analysis of the obtained data, editing of the article;

D.V. Gusev, V.N. Osipov: synthesis of the substance, obtaining data for analysis, editing of the article;

I.S. Golubeva: conducting the experiments.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

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

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

М.П. Киселева / M.P. Kiseleva: <https://orcid.org/0000-0002-4309-6722>

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

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

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

О.Л. Орлова / O.L. Orlova: <https://orcid.org/0000-0002-4558-0083>

И.С. Голубева / I.S. Golubeva: <https://orcid.org/0000-0002-7263-7444>

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

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

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

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

**Соблюдение правил биоэтики.** Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. Протокол исследования одобрен комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (заключение № 2025-1i от 18.02.2025).

**Compliance with principles of bioethics.** The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. The experimental protocol was approved at a meeting of the Bioethics Commission of the N.N. Blokhin National Medical Research Oncology Center (conclusion No. 2025-1i dated 18.02.2025).

Статья поступила: 27.05.2025. Принята к публикации: 15.10.2025. Опубликовано онлайн: 10.12.2025.

Article submitted: 27.05.2025. Accepted for publication: 15.10.2025. Published online: 10.12.2025.

# Особенности экспансии и иммунофенотипа первичной культуры НК- и НКТ-клеток человека под действием различных активаторов пролиферации

П.О. Фёдорова<sup>1-3</sup>, И.О. Чикилева<sup>1</sup>, А.И. Токатлы<sup>4</sup>, А.И. Усов<sup>4</sup>, М.И. Билан<sup>4</sup>, Н.Э. Нифантьев<sup>4</sup>, М.В. Киселевский<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5А;

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119048 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

<sup>4</sup>ФГБНУ «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского» Российской академии наук; Россия, 119991 Москва, Ленинский пр-кт, 47

**Контакты:** Полина Олеговна Фёдорова [ppolite@mail.ru](mailto:ppolite@mail.ru)

**Введение.** Экспансия натуральных киллеров (НК) и натуральных киллеров Т-клеток (НКТ-клеток) *ex vivo* является важной задачей при создании химерного рецептора антигена НК- и НКТ-клеток. Наиболее часто для экспансии лимфоцитов используют моноклональные антитела (МАТ) к CD (cluster of differentiation) 3- и CD28-рецепторам. Другими хорошо изученными Т-клеточными митогенами являются L-фитогемагглютинин (L-PHA) и конканавалин А (Con-A). Перспективным, но малоизученным подходом представляется *in vitro* активация иммунных клеток полисахаридом фукозилированным хондроитинсульфатом (FCS), который выделен из морского огурца *Cucumaria japonica* и способен активировать иммунные клетки и стимулировать гемопоэз.

**Цель исследования** – выявление оптимального способа активации НК- и НКТ-клеток в первичной культуре мононуклеарных клеток (МНК): МАТ к CD3- и CD28-рецепторам, L-PHA, Con-A, а также комбинации МАТ к CD3- и CD28-рецепторам и FCS.

**Материалы и методы.** В качестве источника МНК человека использовали периферическую кровь и лейкоцитарно-тромбоцитарный концентрат. После выделения МНК проводили их активацию с помощью сорбированных МАТ к CD3- и CD28-рецепторам, L-PHA, Con-A или комбинации МАТ + FCS. Затем осуществляли культивирование лимфоцитов в присутствии интерлейкина 2, периодически оценивая прирост общего количества клеток, экспрессию поверхностных маркеров и цитотоксическую активность.

**Результаты.** Было показано, что L-PHA наиболее эффективно стимулировал деление Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) и НК-клеток (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) относительно других режимов активации: доля клеток данных популяций после активации L-PHA была наибольшей. Con-A значительно стимулировал деление Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>). При сравнении активации клеток под воздействием МАТ относительно L-PHA и Con-A наблюдался наибольший прирост количества НКТ-клеток (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>). Добавление FCS при стимуляции МАТ приводило к увеличению пролиферации лимфоцитов.

**Заключение.** Таким образом, среди представленных способов активации МНК для стимуляции деления НК- и НКТ-клеток наиболее предпочтительным являлся способ активации МАТ + FCS, поскольку при этом наблюдался наибольший прирост общего количества клеток при максимальной доле CD56<sup>+</sup>-лимфоцитов, составляющей 58,9 % к концу срока культивирования.

**Ключевые слова:** натуральные киллеры с химерным антигенным рецептором, натуральные киллеры Т-клетки с химерным антигенным рецептором, L-фитогемагглютинин, конканавалин А, фукозилированный хондроитинсульфат

**Для цитирования:** Фёдорова П.О., Чикилева И.О., Токатлы А.И. и др. Особенности экспансии и иммунофенотипа первичной культуры НК- и НКТ-клеток человека под действием различных активаторов пролиферации. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(4):64–76.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-64-76>

## Features of expansion and immunophenotype of primary culture of human NK and NKT cells under the influence of various proliferation activators

Polina O. Fedorova<sup>1-3</sup>, Irina O. Chikileva<sup>1</sup>, Alexandra I. Tokatly<sup>4</sup>, Anatoly I. Usov<sup>4</sup>, Maria I. Bilan<sup>4</sup>, Nikolay E. Nifantiev<sup>4</sup>, Mikhail V. Kiselevskiy<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums; 5A Maly Kazenny Lane, Moscow 105064, Russia;

<sup>3</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenovskiy University), Ministry of Health of Russia; build. 2, 8 Trubetskaya St., 119048 Moscow, Russia;

<sup>4</sup>N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences; 47 Leninsky Prospekt, Moscow 119991, Russia

**Contacts:** Polina Olegovna Fedorova [ppolite@mail.ru](mailto:ppolite@mail.ru)

**Introduction.** *Ex vivo* expansion of natural killer (NK) and natural killer T-cells (NKT) cells is an important element in the generation of chimeric antigen receptor NK and NKT cells. Monoclonal antibodies (mAbs) to CD (cluster of differentiation) 3 and CD28 receptors are most often used for lymphocyte expansion. Other well-studied T-cell mitogens include phytohaemagglutinin-L (L-PHA) and concanavalin A (ConA). A promising but poorly studied approach is *in vitro* activation of immune cells with the polysaccharide fucosylated chondroitin sulfate (FCS) isolated from the sea cucumber *Cucumaria japonica*, which is able to activate immune cells and stimulate hematopoiesis.

**Aim.** To identify the optimal method for NK and NKT cell activation in primary lymphocyte culture. For this purpose, we tested mAbs to CD3 and CD28 receptors, L-PHA, ConA, and a combination of mAbs to CD3 and CD28 receptors and FCS.

**Materials and methods.** Peripheral blood and leukocyte-platelet concentrate were used as a source of peripheral blood mononuclear cells (PBMC). After isolation of PBMC, they were activated using adsorbed mAbs to CD3 and CD28 receptors, L-PHA, ConA, or a mAbs + FCS combination. Then, lymphocytes were cultured in the presence of IL-2, periodically assessing the increase in the total number of cells, expression of surface markers, and cytotoxic activity.

**Results.** It was shown that L-PHA best stimulated the expansion of T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>) and NK cells (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) relative to other activation modes. Under the influence of ConA, the division of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> lymphocytes was significantly activated. When comparing the activation of cells under the influence of MAT relative to L-PHA and ConA, the most pronounced increase in the CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> population was observed. The addition of FCS during MAT stimulation led to an increase in lymphocyte proliferation.

**Conclusion.** Thus, among the presented methods of PBMC activation for stimulating the expansion of NK and NKT cells, the most preferable was the MAT + FCS activation method, since it resulted in the greatest increase in the total number of cells with a maximum proportion of CD56<sup>+</sup> lymphocytes, amounting to 58.9% by the end of the culturing period.

**Keywords:** natural killer cells with chimeric antigen receptor, natural killer T-cells with chimeric antigen receptor, phytohaemagglutinin-L, concanavalin A, fucosylated chondroitin sulfate

**For citation:** Fedorova P.O., Chikileva I.O., Tokatly A.I. et al. Features of expansion and immunophenotype of primary culture of human NK and NKT cells under the influence of various proliferation activators. *Rossiiskij bioterapevticeskij zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2025;24(4):64–76. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-64-76>

### Введение

Одним из перспективных и активно развивающихся направлений иммунотерапии рака является создание и последующее введение пациенту генетически модифицированных натуральных киллеров (НК), популяция которых обладает выраженными естественными противоопухолевыми свойствами [1]. Генетические манипуляции с данными клетками необходимы для внедрения на их поверхность химерного рецептора антигена (CAR), который способен более эффективно распознавать опухолевые антигены и проводить активационный сигнал внутрь клетки-эффектора.

В настоящее время большинство доклинических разработок и клинических исследований посвящено созданию препаратов на основе CAR-T-лимфоцитов, поскольку Т-клетки легко получить от пациента в большом количестве, а также потому, что данная клеточная популяция после активации обладает выраженной клональной экспансией [2]. Однако, несмотря на доказанную противоопухолевую активность CAR-T-клеток, CAR-T-терапия имеет ряд недостатков: это и длительное индивидуализированное производство, требующее высокотехнологического оснащения, и значительная стоимость препарата, и появление тяжелых побочных

явлений при введении пациенту такого клеточного продукта [3].

Вследствие этого альтернативным источником иммунных клеток для CAR-терапии являются НК-клетки и натуральные киллеры Т-клетки (НКТ-клетки). Главным достоинством выбора НК-клеток для иммунотерапии является отсутствие системной токсичности CAR-НК-клеток. При их использовании не требуется подбор донора и реципиента по системе главного лейкоцитарного антигена человека (HLA), так как инфузия НК-клеток донора не вызывает реакции «трансплантат против хозяина» у реципиента [4]. НКТ-клетки для CAR-терапии используются предпочтительно благодаря следующим свойствам: выраженной цитотоксичности, осуществляемой посредством прямой цитотоксичности или активации  $\alpha$ Т-клеток [5], снижению ингибирующей активности опухолеассоциированных макрофагов и миелоидных супрессорных клеток [6], а также отсутствию риска развития реакции «трансплантат против хозяина» ввиду возможности активации через рецепторы НК-клеток [7]. Так, CAR-НК- и CAR-НКТ-клетки могут быть изготовлены не «по запросу», а в плановом режиме массового производства, что снижает себестоимость препарата, делает его более доступным для лечения различных слоев населения, а также позволяет незамедлительно начать курс иммунотерапии после постановки диагноза [8].

Тем не менее разработка биомедицинских клеточных продуктов на основе CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток, обладающих высокой противоопухолевой активностью, является сложным технологическим процессом. Главные задачи данного производства — это экспрессия CAR-рецептора на поверхности лимфоцитов, обогащение клеток, увеличение их цитотоксичности, а также минимизация контаминации Т-клетками. Экспансия НК- и НКТ-клеток *ex vivo* остается важной задачей при создании CAR-препарата, поскольку для иммунотерапии требуется введение пациенту больших доз модифицированных лимфоцитов. Вне зависимости от источника НК- и НКТ-клеток в организме человека невозможно сразу получить чистые клеточные популяции, поскольку они не существуют изолированно. Именно поэтому для обогащения НК- и НКТ-клеток и получения культуры, состоящей преимущественно из этих лимфоцитов, используются методы магнитной сепарации или сортировки клеток. Разделение клеточных популяций проводится до начала культивирования или является его конечным этапом [9]. Более предпочтительна сепарация на финальном этапе культивирования вследствие потенциально положительного воздействия других популяций лимфоцитов на НК-клетки при сокультивировании, однако нельзя исключать и взаимное ингибирование между

популяциями. Целенаправленное культивирование НК в присутствии других иммунных клеток, которые в данном случае называются аутологичными фидерными клетками, является одним из подходов к стимуляции пролиферации НК- и НКТ-клеток и поддержанию их функциональной активности посредством секреции провоспалительных цитокинов и прямого межклеточного взаимодействия [10].

Длительность культивирования НК- и НКТ-клеток зависит от конкретной методики и колеблется от 7 до 21 дня. Вне зависимости от наличия или отсутствия разделения популяций в начале культивирования иммунные клетки проходят этап активации. Наиболее часто для экспансии НК-клеток используют моноклональные антитела (МАТ) к CD (cluster of differentiation) 3- и CD28-рецепторам [11]. Такой способ стимуляции пролиферации может оказаться достаточно эффективным для обогащения популяции НКТ-клеток, поскольку они наряду с Т-лимфоцитами экспрессируют Т-клеточный рецептор. Однако при использовании МАТ для активации первичной культуры лимфоцитов без разделения клеточных популяций происходит соактивация Т-лимфоцитов, которые обладают более выраженной пролиферативной активностью [12], поэтому при использовании такого подхода этап разделения клеточных популяций является необходимостью.

Другими хорошо изученными Т-клеточными митогенами являются L-фитогемагглютинин (L-РНА) и конканавалин А (Con-A) [13]. L-РНА представляет собой лектин, полученный из красной фасоли, который связывается с рецепторами на поверхности Т-клеток и стимулирует метаболическую активность и деление клеток [14]. Con-A также является лектином, но экстрагированным из семян *Canavalia ensiformis* и способным избирательно стимулировать Т-лимфоциты [15]. Оба указанных лектина активируют Т-клетки не только посредством классической активации через Т-клеточный рецептор, но и взаимодействуя с иными рецепторами клеточной мембраны [16].

Перспективным, но малоизученным направлением на данный момент представляется *in vitro* активация иммунных клеток фукозилированным хондроитинсульфатом (FCS) — полисахаридом, выделенным из морского огурца *Cucumaria japonica* [17–22].

**Цель данного исследования** — выявление оптимального способа активации НК- и НКТ-клеток в первичной культуре мононуклеарных клеток (МНК): МАТ к CD3- и CD28-рецепторам, L-РНА, Con-A, а также комбинации МАТ к CD3- и CD28-рецепторам и FCS. Действие активаторов оценивали по показателям цитотоксичности по отношению к опухолевым клеткам, пролиферативной активности и экспрессии активационных маркеров.

## Материалы и методы

### Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови и лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата

Выделение мононуклеарных клеток (МНК) из периферической крови и лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата проводили с использованием метода седиментации в одноступенчатом градиенте плотности фикола ( $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ ). Кровь из пробирок, содержащих этилендиаминтетрауксусную кислоту, разводили в 2 раза раствором Хенкса («ПанЭко», Россия). При выделении клеток из лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата его центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин и комнатной температуре (23 °C), отбирали лейкоцитарный слой и разводили его раствором Хенкса в 3 раза. Затем, вне зависимости от источника МНК, образцы наслаивали на 1,5 мл фикола (Ficoll Paque, GE Healthcare, США) и центрифугировали в течение 25 мин при 1500 об/мин и комнатной температуре (23 °C). Отбирали слой МНК и проводили 3-кратную отмывку раствором Хенкса, центрифугируя в течение 5 мин при 1500 об/мин и комнатной температуре (23 °C), отбирая после этого надосадочную жидкость. После этого проводили подсчет живых клеток с использованием красителя трипанового синего («ПанЭко», Россия) в автоматическом счетчике клеток Luna II (Logos biosystems, Республика Корея). Показатель жизнеспособности >90% считали удовлетворительным. Клетки доводили до рабочей концентрации  $3,5\text{--}4 \times 10^6/\text{мл}$  с помощью питательной среды DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), содержащей 4,5 г/л глюкозы («ПанЭко», Россия), а также 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone, США), пенициллин-стрептомицин («ПанЭко», Россия). После этого свежeweделенные МНК подвергали активации.

### Сорбция моноклональных антител для последующей активации мононуклеарных клеток

Для активации МНК использовали МАТ к CD3- и CD28-рецепторам (BioLegend, США) в различных концентрациях: от 1 до 10 мкг/мл для анти-CD3-антител и от 2 до 20 мкг/мл — для анти-CD28-антител. Соотношение анти-CD3-антител к анти-CD28-антителам всегда составляло 1 к 2. Для достижения заданной концентрации антител изготавливали их растворы в стерильном фосфатном буферном солевом растворе (PBS) и добавляли по 1 мл/лунка в стерильный 12-луночный культуральный планшет (SPL life Sciences, Республика Корея). Планшеты инкубировали в течение 5 ч при температуре 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе модели SCO5A (Sheldon Manufacturing Inc, США) и проводили последующую 3-кратную отмыв-

ку от несвязавшихся антител с помощью 1% раствора бычьего сывороточного альбумина (Sigma, Roedermark, Германия) в PBS.

### Активация свежeweделенных мононуклеарных клеток

При активации МАТ суспензию МНК вносили к сорбированным антителам в концентрации  $3,5\text{--}4 \times 10^6/\text{мл}$ , после чего клетки инкубировали в течение 48 ч при температуре 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. В качестве активаторов также применяли L-РНА (Sigma, США), Con-A (Sigma, США) и FCS. FCS, использованный в настоящей работе, был выделен в результате экстракции суммы сульфатированных полисахаридов из голотурии дальневосточной *Cucumaria japonica* и последующего фракционирования с помощью анионообменной хроматографии. По данным химических и физико-химических методов анализа полисахарид содержит главную цепь из повторяющихся дисахаридных фрагментов [→3)-β-D-GalNAc-(1→4)-β-D-GlcA-(1→]. В главной цепи сульфатированы по O-4 и O-6 остатки галактозамина и по O-3 (примерно на 33%) — остатки глюкуроновой кислоты. Остатки α-L-фукозы, преимущественно в виде 3,4- и 2,4-дисульфатированных звеньев в соотношении 4:1, присоединены в виде единичных боковых ответвлений в положения 3 остатков глюкуроновой кислоты главной цепи [17]. Для активации L-РНА или Con-A прибавляли к суспензии свежeweделенных МНК в диапазоне концентраций от 5 до 20 мкг/мл для L-РНА и от 2,5 до 15 мкг/мл для Con-A. Соинкубацию проводили в стерильных 12-луночных культуральных планшетах (SPL life Sciences, Республика Корея) в течение 48 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °C. FCS-вещество прибавляли к суспензии свежeweделенных МНК в диапазоне концентраций от 1 мкг/мл до 50 мкг/мл и суспензию клеток сразу вносили в лунки с сорбированными антителами.

### Определение пролиферации клеток с помощью N-сукцинимидилового эфира 6-карбоксихлорофлуоресцеина

Для оценки пролиферации клеток в 1-е сутки после активации проводили мечение клеток с помощью витального флуоресцентного красителя N-сукцинимидилового эфира 6-карбоксихлорофлуоресцеина (CFSE, Invitrogen, США). Мечение МНК осуществляли непосредственно перед началом активации. Для этого клетки доводили до концентрации, составляющей от  $0,5 \times 10^6/\text{мл}$  до  $10 \times 10^7/\text{мл}$ . Затем к 1 мл клеточной суспензии добавляли 110 мкл CFSE, разведенного в 100 раз в PBS, и быстро перемешивали на вортексе. Клетки инкубировали в центрифужной пробирке на 15 мл (ApexLab, Россия) при комнатной температуре (23 °C) в течение 5 мин в темноте. Клетки

отмывали 3 раза в 10 мл PBS с 5% FBS при центрифугировании в течение 5 мин при 1500 об/мин и комнатной температуре и отбирали после этого надосадочную жидкость. Для определения интенсивности клеточного деления в качестве контроля использовали немеченые неактивированные клетки (естественная, минимальная флуоресценция) и меченые неактивированные клетки (максимальная флуоресценция). Дальнейшую оценку пролиферации проводили методом проточной цитометрии.

### Культивирование лимфоцитов

Культивирование лимфоцитов проводили в течение 21 дня с момента выделения МНК. Клетки культивировали в 12- и 6-луночных культуральных планшетах (SPL life Sciences, Республика Корея) и культуральных флаконах 25 см<sup>2</sup> (SPL life Sciences, Республика Корея) в присутствии питательной среды DMEM с 4,5 г/л глюкозы, 10% FBS, 250–500 IU/мл человеческого рекомбинантного интерлейкина 2 (Xuri, Китай) при температуре 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Перед подсчетом клеток с помощью световой микроскопии производили контроль морфологических характеристик лимфоцитов и визуальный контроль отсутствия микробной контаминации. С использованием трипанового синего и автоматического счетчика клеток проводили оценку жизнеспособности и количества культивируемых клеток. Показатель жизнеспособности >90% считали удовлетворительным. Концентрацию клеток при культивировании поддерживали в диапазоне от 3 × 10<sup>5</sup>/мл до 1 × 10<sup>6</sup>/мл. Количество НК- и НКТ-клеток рассчитывали следующим образом: количество НК-клеток = общее количество культивируемых лимфоцитов × доля CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>-клеток; количество НКТ-клеток = общее количество культивируемых лимфоцитов × доля CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>-клеток.

### Ведение культуры клеток

В работе использовали линию клеток T47D HER2<sup>+</sup>, полученную из коллекции клеточных культур НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Линию T47D HER2<sup>+</sup> культивировали на среде DMEM, содержащей 4,5 г/л глюкозы, 10% FBS и генетицин (0,4 мг/мл) («ПанЭко», Россия). Культуру клеток инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °С.

### Проточная цитофлуориметрия

Методом проточной цитофлуориметрии производили оценку пролиферации меченных CFSE клеток, а также анализ экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов. На этапе пробоподготовки живые клетки подсчитывали и доводили до концентрации 1 × 10<sup>6</sup>/мл. К 100 мкл клеток добавляли меченные флуорохромом МАТ в концентрациях, рекомендо-

ванных производителем. Инкубировали в течение 30 мин при температуре 4 °С в холодильнике (Hitachi, Япония). Затем производили 3-кратную отмывку раствором PBS от несвязавшихся антител, центрифугируя 1500 об/мин в течение 5 мин при температуре 23 °С и удаляя надосадочную жидкость. К осадку прибавляли 200 мкл PBS и раствор пропидия йодида до конечной концентрации 30 нг/мл (Sigma, США). Изучение экспрессии поверхностных маркеров осуществляли при использовании следующих МАТ: анти-CD3-PerCP (BD Pharmingen, США), анти-CD3-FITC (Beckman Coulter, США), анти-CD56-PE (Life Technologies, США), анти-CD (56<sup>+</sup>16) – PE (Beckman Coulter, США), анти-CD8-APC (Invitrogen, США), анти-CD4-FITC (BD Pharmingen, США), анти-CD16-FITC (BD Pharmingen, США), анти-CD16-APC (Invitrogen, США), анти-CD16-FITC (BD Pharmingen, США), анти-CD16-PE (BD Pharmingen, США), анти-CD25-APC (BD Pharmingen, США), анти-NKp30/CD337-PE (BD Pharmingen, США), анти-NKG2D/CD314-APC (BD Pharmingen, США), анти-CD38-FITC (BD Pharmingen, США), анти-CD69-PE (BD Pharmingen, США). Комбинацию меченных флуорохромами антител для обработки проб подбирали с учетом особенности диапазона детекции длины волны каждого флуорохрома. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Novocyte (ACEA Biosciences Inc, США) с использованием программного обеспечения Novo-Express 1.5.0. Погибшие клетки исключали из анализа по показателям рассеивания. Анализировали не менее 10 тыс. живых клеток.

### Цитотоксический тест

Для оценки эффекторной функции культивируемых лимфоцитов применяли раствор резазурина в концентрации 5 мг/мл (Sigma-Aldrich, США). В качестве культуры-мишени использовали адгезионную культуру T47D-HER2<sup>+</sup>. Цитотоксический тест проводили в стерильных 96-луночных планшетах (SPL life Sciences, Республика Корея), в которые одновременно вносили клетки-эффекторы и клетки-мишени в соотношении 5:1. При проведении цитотоксического теста концентрация клеток-мишеней составляла 0,5 × 10<sup>4</sup> кл/лунку. В качестве отрицательного контроля мишеней использовали лунки, в которые вместо эффекторов вносили полную ростовую среду DMEM. В качестве отрицательного контроля эффекторов задействовали лунки, в которые вместо мишеней вносили полную ростовую среду DMEM. Конечный объем в каждой контрольной или экспериментальной лунке составлял 220 мкл. Каждая анализируемая точка имела 3 повтора. Затем планшет инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °С в течение суток. На следующий день в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора резазурина аналогично протоколу

AlamarBlue Cell Viability Reagent Product Information Sheet (Pub.No. MAN0018317 C.0). Затем планшет инкубировали в течение суток в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °С и измеряли интенсивность флуоресценции на мультирежимном планшетном ридере Spark (Tecan, Швейцария). Анализ проводили при длине возбуждения 560 нм и длине эмиссии 600 нм с использованием программного обеспечения Sparkcontrol v3.1. Цитотоксичность  $X$  (%) оценивали по следующей формуле:

$$X = (1 - ((\text{Э} + \text{М}) - \text{Э})/\text{М}) \times 100,$$

где  $\text{Э} + \text{М}$  – среднее значение интенсивности флуоресценции для 3 аналогичных лунок, в которых находились клетки-эффекторы и клетки-мишени;  $\text{Э}$  – среднее значение интенсивности флуоресценции для 3 аналогичных лунок, в которых находились только клетки-эффекторы;  $\text{М}$  – среднее значение интенсивности флуоресценции для 3 аналогичных лунок, в которых находились только клетки-мишени.

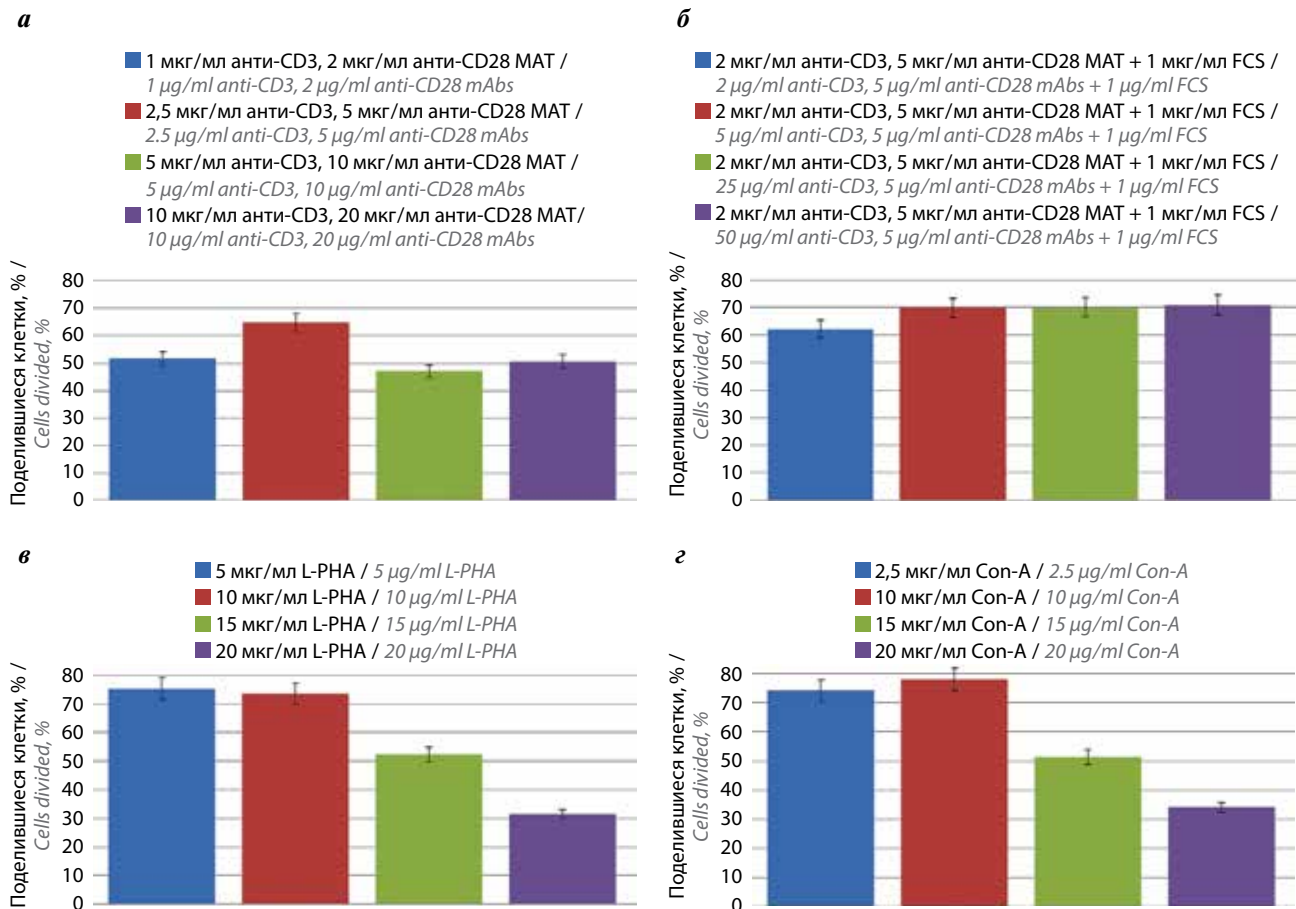
### Статистическая обработка данных

Результаты представлены по единичному донору и отражают средние значения для проведенной серии экспериментов. Данные экспериментов представлены как среднее значение  $\pm$  SD. Результаты проанализированы с использованием программы Statistica 10. Тест ANOVA (two-way analysis of variance) с критерием Tukey HSD (honestly significant difference) использовали для оценки различий. Достоверными считали значения  $p < 0,05$ .

### Результаты

#### Подбор оптимальных концентраций активаторов

Первоочередной задачей исследования был подбор рабочей концентрации анализируемых веществ. Результаты определения пролиферативной активности лимфоцитов на 5-е сутки после активации различными концентрациями анализируемых активаторов представлены на рис. 1. Наибольшей пролиферации клеток достигали при активации с использованием 2,5 мкг/мл анти-CD3, 5 мкг/мл анти-CD28/5 мкг/мл,



**Рис. 1.** Динамика пролиферативной активности лимфоцитов на 5-е сутки после активации: а – моноклональные антитела (MAT); б – MAT + фукозилированный хондроитинсульфат (FCS); в – L-фитогемагглютинин (L-PHA); з – конканавалин А (Con-A)

Fig. 1. Proliferative activity dynamics of lymphocytes on the 5<sup>th</sup> day after activation: а – monoclonal antibodies (mAbs); б – mAbs + fucosylated chondroitin sulfate (FCS); в – L-phytohemagglutinin (L-PHA); з – concanavalin A (Con-A)

L-PHA/5 мкг/мл Con-A. Для FCS оптимальная концентрация составляла 5 мкг/мл. В дальнейшем в работе использовали данные концентрации веществ. Увеличение воздействующих концентраций L-PHA или Con-A приводило к снижению эффективности стимуляции пролиферативного ответа лимфоцитов.

#### Действие активаторов в первые дни после активации

Следующим этапом исследования являлось сравнение эффективности стимулирующего воздействия выбранных веществ на первичную культуру лимфоцитов в первые дни после активации. Детальное исследование влияния тестируемых активаторов на пролиферативную, цитотоксическую активность и иммунофенотип лимфоцитов позволило установить, что уже на 3-и сутки соинкубации с активаторами пролиферативная активность лимфоцитов достоверно повышалась. Тем не менее, как видно из табл. 1, вне зависимости от способа активации статистически значимого различия в пролиферации лимфоцитов не наблюдали. В этот период отмечали достоверное повышение экспрессии активационных маркеров NKG2D, CD38, CD69 и CD25 (табл. 2) и снижение экспрессии NKp30-рецептора. Среди выбранных способов активации наименее выраженное снижение доли NKp30<sup>+</sup>-лимфоцитов относительно контрольной группы наблюдали при активации MAT. При стимуляции клеток L-PHA быстрее появлялся маркер активации CD25, особенно на поверхности CD56<sup>+</sup>-клеток. Примечательно, что прибавление FCS при активации MAT вызывало более выраженную экспрессию CD38,

CD69, CD25-рецепторов, причем существенно возрастала доля CD56<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-клеток (относительно активации только MAT).

#### Действие активаторов на лимфоциты при длительном культивировании в течение 21 дня

Далее было необходимо оценить влияние выбранного способа активации при длительном культивировании. Данные о динамике пролиферации относительно времени культивирования представлены на рис. 2. Наибольший прирост клеток наблюдали при активации MAT + FCS, наименьшим стимулирующим эффектом обладал Con-A. При всех способах активации наблюдали постепенное увеличение эффекторной функции к 21-м суткам культивирования, данные цитотоксического теста представлены в табл. 3.

К 21-му дню культивирования наибольшее абсолютное и исходя из цитометрических данных относительное количество CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>-клеток наблюдали при активации L-PHA, иммунорегуляторный индекс при данном способе активации составлял 0,5 (табл. 4, 5). Наибольший иммунорегуляторный индекс (1,4) наблюдали к 21-му дню культивирования при активации Con-A, а добавление FCS к MAT при активации приводило к снижению иммунорегуляторного индекса относительно активации в присутствии MAT. На 21-й день культивирования наибольшую долю CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>-клеток наблюдали при активации L-PHA и Con-A, а активация MAT и MAT + FCS оказывала существенное влияние на пролиферацию CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>-лимфоцитов (рис. 3,

**Таблица 1.** Сравнение пролиферативной активности лимфоцитов на 3-и сутки после активации анализируемыми стимуляторами клеточного деления

Table 1. Comparison of proliferative activity of lymphocytes on the 3<sup>rd</sup> day after activation by the analyzed stimulators

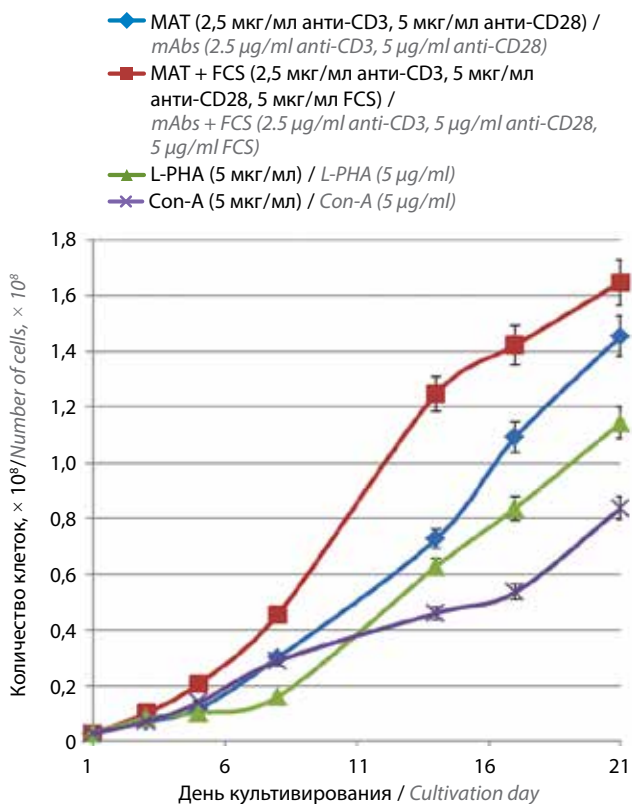
Концентрация активатора Activator concentration	Поделиться клетки, % Divided cells, %
2,5 мкг/мл анти-CD3, 5 мкг/мл анти-CD28 MAT 2.5 mkg/ml anti-CD3, 5 mkg/ml anti-CD28 mABs	43,21 ± 2,1
2,5 мкг/мл анти-CD3, 5 мкг/мл анти-CD28 + 5 мкг/мл FCS 2.5 mkg/ml anti-CD3, 5 mkg/ml anti-CD28 mABs + 5 mkg/ml FCS	43,4 ± 3,4
5 мкг/мл L-PHA 5 mkg/ml L-PHA	42,3 ± 3,2
5 мкг/мл Con-A 5 mkg/ml Con-A	39,71 ± 1,9
Отрицательный контроль (неактивированные МНК) Negative control (not activated PBMC)	7,0 ± 1,5

**Примечание.** Здесь и в табл. 2–5: МНК – мононуклеарные клетки периферической крови, MAT – моноклональные антитела, FCS – фукозилированный хондроитинсульфат, Con-A – конканавалин А, L-PHA – L-фитогемагглютинин.  
Note. Here and in Tables 2–5: PBMC – peripheral blood mononuclear cells, mAbs – monoclonal antibodies, FCS – fucosylated chondroitin sulfate, Con-A – concanavalin A, L-PHA – phytohaemagglutinin-L.

**Таблица 2.** Экспрессия активационных маркеров на поверхности лимфоцитов на 3-и сутки после активации анализируемыми стимуляторами клеточного деления

**Table 2.** Activation markers expression on the surface of lymphocytes on the 3<sup>rd</sup> day after activation by the analyzed stimulators

Показатель Parameter	Доля клеток, % Proportion of cells, %					
	NKG2D <sup>+</sup>	NKp30 <sup>+</sup>	CD38 <sup>+</sup>	CD69 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	CD56 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>
Контроль (неактивированные МНК) Negative control (not activated PBMC)	15,17 ± 3,01	37,0 ± 5,13	1,0 ± 0,74	0,2 ± 0,01	1,26 ± 0,36	0,6 ± 0,16
Активация МАТ Activation of mAbs	26,26 ± 1,64	20,72 ± 1,89	82,13 ± 4,03	80,46 ± 4,02	35,12 ± 3,39	1,94 ± 0,06
Активация МАТ + FCS Activation of mAbs + FCS	25,8 ± 3,41	18,4 ± 2,33	83,82 ± 7,16	85,3 ± 4,68	57,25 ± 5,77	5,91 ± 1,35
Активация L-РНА Activation of L-PHA	28,73 ± 3,01	13,97 ± 4,03	91,82 ± 6,51	93,96 ± 3,65	73,83 ± 4,45	6,92 ± 1,08
Активация Con-A Activation of Con-A	29,37 ± 2,12	10,62 ± 3,36	99,57 ± 1,03	94,04 ± 4,99	72,78 ± 5,98	5,07 ± 1,78



**Рис. 2.** Динамика пролиферативной активности лимфоцитов при длительном культивировании. Здесь и на рис. 3: МНК – мононуклеарные клетки периферической крови, МАТ – моноклональные антитела, FCS – фукозилированный хондроитинсульфат, Con-A – конканавалин А, L-РНА – L-фитогемагглютинин

**Fig. 2.** Dynamics of proliferative activity of lymphocytes during long-term cultivation Here and in Fig. 3: PBMC – peripheral blood mononuclear cells, mAbs – monoclonal antibodies, FCS – fucosylated chondroitin sulfate, L-PHA – phytohaemagglutinin-L, Con-A – concanavalin A

см. табл. 4, 5). Максимальное количество CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>-НКТ-клеток получено при активации комбинацией МАТ + FCS. Активация МАТ или МАТ + FCS усиливала экспрессию NKG2D-рецептора на поверхности CD3<sup>+</sup>- и CD56<sup>+</sup>-лимфоцитов, причем прибавление FCS оказывало большее влияние на экспрессию данного рецептора на поверхности CD56<sup>+</sup>-клеток. При длительном культивировании при активации МАТ доля и абсолютное значение CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов к 21-му дню культивирования оставались наибольшими по сравнению с режимами использования других активаторов. Примечательно, что при активации МАТ или МАТ + FCS к 21-му дню культивирования более выраженную экспрессию CD16-рецептора наблюдали на поверхности CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов, в то время как при активации ФГА или Con-A более высокая экспрессия CD16-маркера была на поверхности CD56-клеток.

### Обсуждение

Суммируя полученные результаты, следует отметить, что выбранные активаторы пролиферации при длительном культивировании влияли на первичную культуру лимфоцитов по-разному. Так, L-РНА наилучшим образом стимулировал деление Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>) и НК-клеток (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) относительно других режимов активации. Увеличение доли, а также абсолютного числа CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов было связано, по-видимому, с пролиферацией CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>-популяции НК-клеток, обладающей выраженными цитотоксическими свойствами. При активации L-РНА появление маркера активации CD25 на поверхности CD56<sup>+</sup>-лимфоцитов также

**Таблица 3.** Цитотоксичность в отношении культуры T47D-HER2+, %, при соотношении клеток-мишеней с клетками-эффекторами 5:1

Table 3. Cytotoxicity against the T47D-HER2+ cell culture, %, at a target-to-effector cell ratio of 5:1

Показатель Parameter	После активации After activation			
	MAT mABs	MAT + FCS mABs + FCS	L-РНА	Con-A
МНК до активации PBMC before activation	63 ± 7			
7-й день культивирования 7 <sup>th</sup> day of cultivation	64 ± 6	66 ± 4	67 ± 4	65 ± 6
14-й день культивирования 14 <sup>th</sup> day of cultivation	73 ± 8	78 ± 7	74 ± 5	78 ± 8
21-й день культивирования 21 <sup>st</sup> day of cultivation	87 ± 6	80 ± 6	83 ± 7	81 ± 8

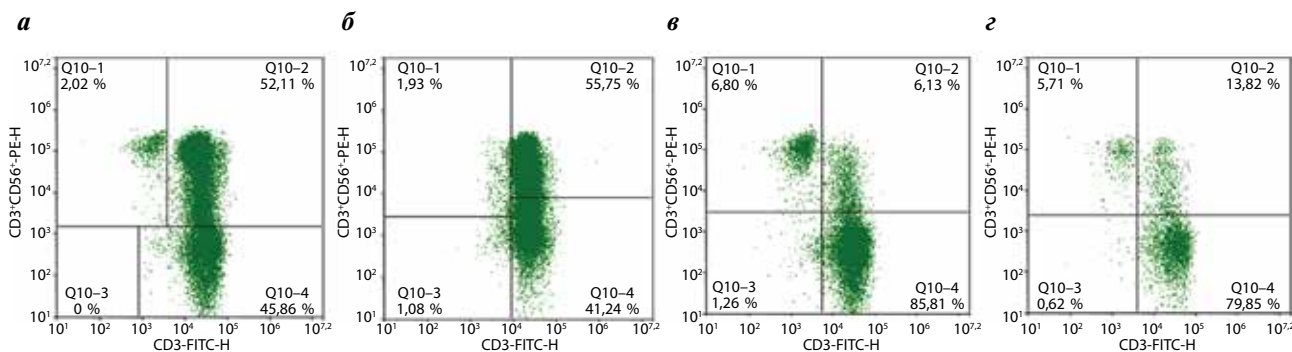
было наивысшим относительно применения других активирующих пролиферацию веществ, что, вероятно, связано с быстрой активацией CD56<sup>+</sup>-клеток в ответ на контакт с L-РНА. Согласно данным литературы, влияние L-РНА на Т-клетки не только приводит к пролиферации Т-клеточного звена, но и стимулирует образование Т-клеток памяти [14].

Несмотря на наименьший прирост количества культивируемых лимфоцитов при воздействии Con-A, данный активатор значительно стимулировал CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-лимфоциты. Данное явление было также описано и в другой научной публикации [13]. Предполагается, что появление популяции хелперов оказало влияние и на деление НКТ-клеток (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), доля которых возрастала относительно стимуляции

L-РНА, хотя нельзя исключать и прямого стимулирующего действия Con-A на популяцию НКТ-клеток. Минимальная, относительно других режимов активации, экспрессия активационного рецептора NKG2D при стимуляции Con-A связана, по-видимому, с небольшой долей CD3<sup>+</sup>- или CD56<sup>+</sup>-клеток-эффекторов.

При сравнении активации клеток под воздействием MAT относительно применения L-РНА и Con-A наблюдали наиболее выраженный прирост CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>-популяции и уменьшение доли CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>-лимфоцитов. Несмотря на экспансивный рост численности НКТ-клеток, абсолютное число Т-лимфоцитов к концу срока культивирования оказалось ниже, чем при стимуляции L-РНА и таким же относительно активации Con-A. Противоположно стимуляции Con-A при активации MAT + FCS наблюдали наибольшую долю NKG2D<sup>+</sup>-клеток, практически вся популяция НКТ-клеток экспрессировала данный активационный маркер. НКТ-лимфоциты являются долгоживущей клеточной популяцией, поэтому использование «классического» Т-клеточного активатора при соблюдении режима длительного культивирования в данном случае приводит к преобладанию этих клеток в первичной культуре иммунных клеток к концу срока культивирования. Вследствие этого многие протоколы для экспансии НК-клеток включают длительный режим культивирования – до 21 дня, в то время как для экспансии Т-лимфоцитов достаточно 7–14 дней [23].

Добавление FCS при стимуляции MAT вызывало более выраженную экспрессию CD38, CD69, CD25-рецепторов на ранних сроках культивирования и приводило к возрастанию доли CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов относительно активации в присутствии MAT. Так



**Рис. 3.** Изменения популяционного состава первичной культуры лимфоцитов к 21-му дню культивирования в зависимости от способа активации. Данные репрезентативного эксперимента, активация: а – MAT; б – MAT + FCS; в – L-РНА; г – Con-A. PE – R-фикоэритрин; FITC – изотиоцианат флуоресцеина; Q10-1: CD3<sup>+</sup>CD(56<sup>+</sup>16)<sup>+</sup>-клетки; Q10-2: CD3<sup>+</sup>CD(56<sup>+</sup>16)<sup>+</sup>-клетки; Q10-3: CD3<sup>+</sup>CD(56<sup>+</sup>16)<sup>-</sup>-клетки; Q10-4: CD3<sup>+</sup>CD(56<sup>+</sup>16)<sup>-</sup>-клетки

Fig. 3. Changes in lymphocyte composition by the 21<sup>st</sup> day of cultivation depending on the activation method. Data from a representative experiment, activation: a – mABs; б – mABs + FCS; в – L-PHA; г – Con-A. PE – R-phycoerythrin; FITC – fluorescein isothiocyanate; Q10-1: CD3<sup>+</sup>CD(56<sup>+</sup>16)<sup>+</sup> cells; Q10-2: CD3<sup>+</sup>CD(56<sup>+</sup>16)<sup>+</sup> cells; Q10-3: CD3<sup>+</sup>CD(56<sup>+</sup>16)<sup>-</sup> cells; Q10-4: CD3<sup>+</sup>CD(56<sup>+</sup>16)<sup>-</sup> cells

Таблица 4. Экспрессия поверхностных маркеров на культивируемых лимфоцитах  
Table 4. Expression of surface markers on cultured lymphocytes

Показатель Parameter	МНК до активации RWMC before activation	Активация Activation											
		МАТ mAbs			МАТ + FCS mAbs + FCS			L-РНА			Соп-А		
		3-й 3 <sup>rd</sup>	11-й 11 <sup>th</sup>	21-й 21 <sup>st</sup>	3-й 3 <sup>rd</sup>	11-й 11 <sup>th</sup>	21-й 21 <sup>st</sup>	3-й 3 <sup>rd</sup>	11-й 11 <sup>th</sup>	21-й 21 <sup>st</sup>	3-й 3 <sup>rd</sup>	11-й 11 <sup>th</sup>	21-й 21 <sup>st</sup>
Доля CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> -клеток, % Proportion of CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> cells, %	79,45 ± 8,4	81,88 ± 9,8	71,03 ± 7,3	45,86 ± 5,6	83,11 ± 9,3	73,62 ± 7,2	41,43 ± 3,0	80,82 ± 8,2	93 ± 6,4	85,81 ± 8,8	71,84 ± 7,7	76,02 ± 7,8	79,85 ± 8,1
Иммунорегуляторный индекс Immunoregulatory index	1,91 ± 0,1	1,9 ± 0,3	0,6 ± 0,2	0,2 ± 0,16	1,9 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,03	1,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,5 ± 0,1	1,9 ± 0,3	1,7 ± 0,2	1,4 ± 0,2
Доля CD56 <sup>+</sup> -клеток, % Proportion of CD56 <sup>+</sup> cells, %	19,44 ± 3,1	16,9 ± 1,8	30,2 ± 3,2	54,13 ± 5,7	18,75 ± 2,1	23,32 ± 2,6	58,91 ± 6,0	17,42 ± 1,8	5,2 ± 0,7	11,45 ± 1,4	18,49 ± 1,9	10,4 ± 1,3	19,52 ± 2,1
Доля CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> -клеток, % Proportion of CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> cells, %	13,14 ± 2,9	12,61 ± 2,8	3,88 ± 0,6	2,02 ± 0,4	13,14 ± 1,4	4,15 ± 0,5	1,81 ± 0,3	13,2 ± 1,6	2,39 ± 0,3	6,12 ± 0,9	12,83 ± 1,5	3,51 ± 0,4	5,74 ± 0,7
Доля CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> -клеток, % Proportion of CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> cells, %	6,53 ± 2,4	4,34 ± 0,8	27,22 ± 3,7	52,11 ± 5,5	5,61 ± 0,6	19,22 ± 2,2	57,12 ± 6,1	4,22 ± 0,7	2,81 ± 0,4	5,45 ± 0,8	5,66 ± 0,6	6,89 ± 0,8	13,82 ± 1,5
Доля NKG2D <sup>+</sup> -клеток, % Proportion of NKG2D <sup>+</sup> cells, %	29,32 ± 3,3	26,08 ± 3,0	69,81 ± 8,1	82,68 ± 8,3	23,68 ± 2,6	65,83 ± 6,7	84,34 ± 7,9	27,73 ± 3,2	57,98 ± 6,3	64,47 ± 7,1	25,92 ± 2,8	31,52 ± 3,3	50,06 ± 5,9

Окончание табл. 4  
End of table 4

Показатель Parameter	МНК до активации РВМС before activation	Активация Activation											
		МАТ mABs			МАТ + FCS mABs + FCS			L-РНА			Соп-А		
		3-й 3 <sup>rd</sup>	11-й 11 <sup>th</sup>	21-й 21 <sup>st</sup>	3-й 3 <sup>rd</sup>	11-й 11 <sup>th</sup>	21-й 21 <sup>st</sup>	3-й 3 <sup>rd</sup>	11-й 11 <sup>th</sup>	21-й 21 <sup>st</sup>	3-й 3 <sup>rd</sup>	11-й 11 <sup>th</sup>	21-й 21 <sup>st</sup>
День культивирования Cultivation day													
Доля CD56 <sup>+</sup> NKG2D <sup>+</sup> - клеток, % Proportion of CD56 <sup>+</sup> NKG2D <sup>+</sup> cells, %	18,61 ± 2,4	15,22 ± 1,8	27,86 ± 4,0	50,84 ± 5,5	14,87 ± 1,7	28,03 ± 3,1	40,36 ± 8,8	16,72 ± 1,9	7,62 ± 0,9	13,49 ± 1,6	17,38 ± 1,6	9,86 ± 1,2	21,54 ± 2,4
Доля CD3 <sup>+</sup> NKG2D <sup>+</sup> - клеток, % Proportion of CD3 <sup>+</sup> NKG2D <sup>+</sup> cells, %	17,48 ± 2,7	14,98 ± 1,8	68,03 ± 7,2	80,66 ± 7,9	14,02 ± 1,5	65,32 ± 6,8	82,41 ± 8,3	15,02 ± 1,7	55,35 ± 6,1	57,37 ± 6,1	16,27 ± 1,7	28,46 ± 2,6	44,62 ± 4,8
Доля CD16 <sup>+</sup> - клеток, % Proportion of CD16 <sup>+</sup> cells, %	17,65 ± 2,4	13,21 ± 2,2	1,99 ± 0,3	7,33 ± 0,8	12,86 ± 1,5	1,49 ± 0,4	6,82 ± 0,7	10,71 ± 1,5	2,22 ± 0,4	6,87 ± 0,7	10,38 ± 1,2	2,96 ± 0,4	4,06 ± 0,6
Доля CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> - клеток, % Proportion of CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> cells, %	5,98 ± 1,4	1,52 ± 0,9	0,57 ± 0,4	5,6 ± 0,5	1,62 ± 0,3	0,66 ± 0,2	5,52 ± 0,7	4,76 ± 0,5	0,24 ± 0,2	0,89 ± 0,2	0,71 ± 0,3	0,42 ± 0,1	0,39 ± 0,2
Доля CD56 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> -кле- ток, % Proportion of CD56 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> cells, %	15,67 ± 1,9	11,69 ± 1,5	1,42 ± 0,5	1,73 ± 0,2	12,07 ± 1,5	1,11 ± 0,2	1,64 ± 0,3	5,95 ± 0,7	1,98 ± 0,4	5,98 ± 0,6	9,67 ± 1,1	2,54 ± 0,3	3,67 ± 0,6

Таблица 5. Абсолютное значение количества клеток, экспрессирующих определенные рецепторы

Table 5. Absolute value of the number of cells expressing certain receptors

Количество клеток, × 10 <sup>6</sup> Number of cells, × 10 <sup>6</sup>	МНК до активации PBMC before activation	Активация на 21-й день культивирования Activation on the 21 <sup>st</sup> day of cultivation			
		MAT mABs	MAT + FCS mABs + FCS	L-РНА	Con-A
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>-</sup>	2,4 ± 0,22	66,7 ± 6,5	68,3 ± 7,1	98,2 ± 10,1	66,9 ± 6,9
CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,4 ± 0,05	2,9 ± 0,3	3,0 ± 0,4	7,0 ± 0,8	4,8 ± 0,5
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,2 ± 0,02	75,8 ± 7,8	94,1 ± 9,6	6,2 ± 0,8	11,6 ± 1,4
NKG2D <sup>+</sup>	0,9 ± 0,1	120,3 ± 11,9	139,0 ± 14,0	73,8 ± 7,7	41,9 ± 4,4
CD16 <sup>+</sup>	0,5 ± 0,06	10,7 ± 1,2	11,2 ± 1,4	7,9 ± 0,9	3,4 ± 0,6
CD56 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	0,8 ± 0,1	2,86 ± 0,4	2,7 ± 0,3	6,8 ± 0,9	3,0 ± 0,4

как при данном способе активации наблюдали наибольшую пролиферацию лимфоцитов, можно предположить, что комбинация MAT + FCS являлась наиболее эффективным из представленных в данной работе способом стимуляции пролиферации первичной культуры лимфоцитов. Среди представленных способов активации МНК для стимуляции деления НК- и НКТ-клеток также наиболее предпочтителен способ активации MAT + FCS, поскольку при этом наблюдается наибольший прирост общего количества клеток при максимальной доле CD56<sup>+</sup>-лимфоцитов, составляющей 58,9%.

Важным вопросом, требующим отдельного исследования, является выяснение механизма действия FCS и идентификация соответствующих клеточных рецепторов, взаимодействующих с FCS. Вероятно, это можно сделать с использованием модифицированных образцов FCS [24], синтетических олигосахаридов, отражающих структурные фрагменты FCS, синтез которых в настоящее время является возможным [25–27].

### Заключение

Таким образом, подбор активатора пролиферации при культивировании первичной культуры лимфоцитов, полученной из МНК без разделения клеточных популяций, следует осуществлять исходя из конкретных экспериментальных задач. Среди рассматриваемых в данной работе стимуляторов пролиферации наиболее предпочтительным вариантом для обогащения популяции CD56<sup>+</sup>-лимфоцитов оказалась комбинация MAT + FCS и режим длительного культивирования в течение 21 дня. Тем не менее, чтобы подтвердить данное утверждение, необходимы дополнительные исследования с анализом других рассматриваемых параметров, например эффективности генетической модификации лимфоцитов, проводимой после этапа активации выбранным митогеном. Для более успешного обогащения целевой популяции НК-клеток предлагается использование других, не описанных в данной работе, активаторов, аллогенных фидерных клеток, являющихся мишенью для НК-клеток, и/или методов разделения клеточных популяций.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Борова Е.А., Жеравин А.А. Натуральные киллеры в иммунотерапии онкологических заболеваний. Сибирский онкологический журнал 2018;17(6):97–104. DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-6-97-104  
Vorobova E.A., Zheravin A.A. Natural killer cells in immunotherapy for cancer. Sibirskiy onkologicheskij zhurnal = Siberian Journal of Oncology 2018;17(6):97–104. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-6-97-104
2. Wik J.A., Skálhegg B.S. T cell metabolism in infection. Front Immunol 2022;13:840610. DOI: 10.3389/fimmu.2022.840610
3. Rafiq S., Hackett C.S., Brentjens R.J. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. Nat Rev Clin Oncol 2020;17:147–67. DOI: 10.1038/s41571-019-0297-y
4. Liu E., Marin D., Banerjee P. et al. Use of CAR-transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors. N Engl J Med 2020;382:545–53. DOI: 10.1056/NEJMoa1910607
5. Simonetta F., Lohmeyer J.K., Hirai T. et al. Allogeneic CAR invariant natural killer T cells exert potent antitumor effects through host CD8 T-cell cross-priming. Clin Cancer Res 2021;27(21):6054–64. DOI: 10.1158/1078-0432.Ccr-21-1329
6. Huang J., Yang Q., Wang W. et al. CAR products from novel sources: a new avenue for the breakthrough in cancer immunotherapy. Front Immunol 2024;15:1378739. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1378739
7. Wolf B.J., Choi J.E., Exley M.A. Novel approaches to exploiting invariant NKT cells in cancer immunotherapy. Front Immunol 2018;9:384. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00384

8. Basar R., Daher M., Rezvani K. Next-generation cell therapies: The emerging role of CAR-NK cells. *Blood Adv* 2020;4(22):5868–76. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020002547
9. Berrien-Elliott M.M., Jacobs M.T., Fehniger T.A. Allogeneic natural killer cell therapy. *Blood* 2023;141(8):856–68. DOI: 10.1182/blood.2022016200
10. Rölle A., Pollmann J., Ewen E. et al. IL-12- producing monocytes and HLA-E control HCMV-driven NKG2C+ NK cell expansion. *J Clin Invest* 2014;124:5305–16. DOI: 10.1172/JCI177440
11. Granzin M., Wagner J., Köhl U. et al. Shaping of natural killer cell antitumor activity by *ex vivo* cultivation. *Front Immunol* 2017;8:458. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00458
12. Wrona E., Borowiec M., Potemski P. CAR-NK cells in the treatment of solid tumors. *Int. J Mol Sci* 2021;22:5899. DOI: 10.3390/ijms22115899
13. Pernold C.P.S., Lagumdziec E., Stadler M. et al. Species comparison: human and minipig PBMC reactivity under the influence of immunomodulating compounds *in vitro*. *Front Immunol* 2024;14:1327776. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1327776
14. Gulden G., Sert B., Teymur T. et al. CAR-T cells with phytohemagglutinin (PHA) provide anti-cancer capacity with better proliferation, rejuvenated effector memory, and reduced exhausted T cell frequencies. *Vaccines (Basel)* 2023;11(2):313. DOI: 10.3390/vaccines11020313
15. Yang J., Xie W., Yu K. et al. Methyl butyrate attenuates concanavalin A-induced autoimmune hepatitis by inhibiting Th1-cell activation and homing to the liver. *Cell Immunol* 2022;378:104575. DOI: 10.1016/j.cellimm.2022.104575
16. Kay J.E. Mechanisms of T lymphocyte activation. *Immunol Lett* 1991;29(1-2):51–4. DOI: 10.1016/0165-2478(91)90198-j
17. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Dmitrenok A.S. et al. Structure and biological activity of a fucosylated chondroitin sulfate from the sea cucumber *Cucumaria japonica*. *Glycobiology* 2016;26(5):449–59. DOI: 10.1093/glycob/cwv119
18. Anisimova N., Ustyuzhanina N., Bilan M. et al. Fucoidan and fucosylated chondroitin sulfate stimulate hematopoiesis in cyclophosphamide-induced mice. *Mar Drugs* 2017;15(10):301. DOI: 10.3390/md15100301
19. Ustyuzhanina N.E., Anisimova N.Y., Bilan M.I. et al. Chondroitin sulfate and fucosylated chondroitin sulfate as stimulators of hematopoiesis. *Pharmaceuticals* 2021;14(11):1074. DOI: 10.3390/ph14111074
20. Kiselevskiy M.V., Anisimova N.Yu., Ustyuzhanina N.E. et al. Perspectives for the use of fucoidans in clinical oncology. *Int J Mol Sci* 2022;23(19):11821. DOI: 10.3390/ijms231911821
21. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Anisimova N.Yu. et al. Fucosylated chondroitin sulfates with rare disaccharide branches from the sea cucumbers *Psolus peronii* and *Holothuria nobilis*: structures and influence on hematopoiesis. *Pharmaceuticals (Basel)* 2023;16(12):1673. DOI: 10.3390/ph16121673
22. Chikileva I.O., Bruter A.V., Persiyantseva N.A. et al. Anti-cancer potential of transiently transfected HER2-specific human mixed CAR-T and NK cell populations in experimental models; initial studies on fucosylated chondroitin sulfate usage for safer treatment. *Biomedicines* 2023;11(9):2563. DOI: 10.3390/biomedicines11092563
23. Schmidt D., Ebrahimabadi S., Gomes K.R.S. et al. Engineering CAR-NK cells: how to tune innate killer cells for cancer immunotherapy. *Immunother Adv* 2022;2(1):ltac003. DOI: 10.1093/immadv/ltac003
24. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Anisimova N.Yu. et al. Depolymerization of a fucosylated chondroitin sulfate from the sea cucumber *Cucumaria japonica*: structure and biological activity of the product. *Carbohydr Polym* 2022;281:119072. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.119072
25. Ustyuzhanina N.E., Fomitskaya P.A., Gerbst A.G. et al. Synthesis of the oligosaccharides related to branching sites of fucosylated chondroitin sulfates from sea cucumbers. *Mar Drugs* 2015;13(2):770–87. DOI: 10.3390/md13020770
26. Vinnitskiy D.Z., Ustyuzhanina N.E., Dmitrenok A.S. et al. Synthesis and NMR analysis of model compounds related to fucosylated chondroitin sulfates: GalNAc and Fuc(1→6)GalNAc derivatives. *Carbohydr Res* 2017;438:9–17. DOI: 10.1016/j.carres.2016.11.015
27. Gambaryan A.S., Tuzikov A.B., Byramova N.E. et al. Human influenza virus recognition of sialo-sugar determinants probed using a panel of sialooligosaccharides. *FEBS Lett* 1995;366(1):57–60. DOI: 10.1016/0014-5793(95)00488-U

#### Вклад авторов

П.О. Фёдорова: получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;  
 И.О. Чикилева: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных (включая статистический), обзор публикаций по теме статьи;  
 А.И. Токатлы, А.И. Усов, М.И. Билан: получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи;  
 Н.Э. Нифантьев: получение данных для анализа, анализ и последующая интерпретация полученных данных;  
 М.В. Киселевский: обзор публикаций по теме статьи, анализ и последующая интерпретация полученных данных.

#### Author's contributions

P.O. Fedorova: obtaining data for analysis, review of publications on the topic of the article, writing the text of the manuscript;  
 I.O. Chikileva: research design development, analysis of the obtained data, review of publications on the topic of the article;  
 A.I. Tokatly, A.I. Usov, M.I. Bilan: obtaining data for analysis, review of publications on the topic of the article;  
 N.E. Nifantiev: obtaining data for analysis, analysis and subsequent interpretation of the obtained data;  
 M.V. Kiselevskiy: review of publications on the topic of the article, analysis and subsequent interpretation of the obtained data.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

П.О. Фёдорова / P.O. Fedorova: <https://orcid.org/0000-0001-7478-8783>  
 И.О. Чикилева / I.O. Chikileva: <https://orcid.org/0000-0003-0769-1695>  
 А.И. Токатлы / A.I. Tokatly: <https://orcid.org/0000-0003-2855-8738>  
 А.И. Усов / A.I. Usov: <https://orcid.org/0009-0008-7262-2235>  
 М.И. Билан / M.I. Bilan: <https://orcid.org/0009-0005-2390-3776>  
 Н.Э. Нифантьев / N.E. Nifantiev: <https://orcid.org/0000-0002-0727-4050>  
 М.В. Киселевский / M.V. Kiselevskiy: <https://orcid.org/0000-0002-0132-167X>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №19-73-30017-П).

**Funding.** This work was financially supported by the Russian Science Foundation (grant No. 19-73-30017-P).

**Статья поступила:** 19.04.2025. **Принята к публикации:** 20.10.2025. **Опубликована онлайн:** 10.12.2025.

**Article submitted:** 19.04.2025. **Accepted for publication:** 20.10.2025. **Published online:** 10.12.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-77-84>

# Опыт разработки погружных изделий для остеореконструкции с эффектом памяти формы и антибактериальной активностью на основе полилактида/гидроксиапатита

О. В. Лебединская<sup>1</sup>, П. А. Ковалева<sup>2</sup>, А. И. Черемных<sup>2</sup>, В. А. Львов<sup>2</sup>, П. М. Качалина<sup>2</sup>, Т. С. Спирина<sup>3,4</sup>, Г. Бабаева<sup>3,4</sup>, Н. В. Пашинцева<sup>5</sup>, И. Н. Кабановская<sup>1</sup>, Н. Ю. Анисимова<sup>2-4</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е. А. Вагнера» Минздрава России; Россия, 614001 Пермь, ул. Петропавловская, 26;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»; Россия, 119049 Москва, Ленинский пр-кт, 4;

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

<sup>4</sup>ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6;

<sup>5</sup>ФГБНУ «Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского» Российской академии наук; Россия, 119991 Москва, Ленинский пр-кт, 47

**Контакты:** Ольга Витальевна Лебединская [lebedinska@mail.ru](mailto:lebedinska@mail.ru)

**Введение.** На основании результатов оценки механических и прочностных характеристик и изучения различных аспектов биологической активности композиционный материал на основе полилактида и гидроксиапатита (ПЛА/ГА) рассматривается как перспективный компонент имплантатов с эффектом памяти формы для остеореконструктивных операций.

**Цель исследования** – оценка характера реакции организма лабораторных животных на имплантацию образцов изделий на основе ПЛА/ГА, а также перспективы их использования в качестве платформы для локального введения антибактериальных средств.

**Материалы и методы.** Экспериментальные образцы были изготовлены в виде хирургических скоб из композиционного материала ПЛА/ГА с содержанием гидроксиапатита 15 % массовой доли примесей в виде игольчатых наночастиц 90 нм. Для изучения биосовместимости и биodeградации *in vivo* скобы имплантировали мышам подкожно. Через 50 дней образцы извлекали, оценивали изменение их массы и изучали гистологические срезы тканей в области контакта с имплантатами. Для изучения перспектив использования ПЛА/ГА в качестве платформы для локальной доставки антибактериального препарата на поверхность образцов наносили 35 мкг смеси амоксициллина/клавулановой кислоты с последующей промывкой. Нагруженные образцы помещали на поверхность агара Мюллера–Хинтон, засеянного *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Через 20 ч инкубации оценивали наличие зон ингибирования колониеобразования вокруг образцов и дисков.

**Результаты.** Реализацию эффекта памяти формы осуществляли нагреванием образцов, вследствие чего наблюдали смыкание исходно незамкнутых скоб для фиксации. Несмотря на то что не удалось установить достоверного изменения массы образцов за время их нахождения в теле животных, гистологическое исследование окружающих тканей выявило признаки их начальной биodeградации *in vivo*. Не было обнаружено массовой инфильтрации тканей контактной области клетками воспаления, характерными для острой воспалительной реакции. Однако в некоторых образцах наблюдались единичные гигантские клетки инородных тел и одиночные макрофаги, лимфоциты и нейтрофилы. Микробиологические исследования показали эффект торможения роста колоний *E. coli* и *S. aureus* вокруг образцов.

**Заключение.** Полученные результаты доказали биосовместимость ПЛА/ГА с содержанием ГА 15 % массовой доли примесей, поскольку его имплантация не индуцировала развития острой реакции воспаления или отторжения у экспериментальных животных. Кроме того, было показано, что изделия из этого материала могут быть использованы в качестве платформы для локальной доставки антибактериальных средств.

**Ключевые слова:** полилактид, гидроксиапатит, эффект памяти формы, имплантат, биосовместимость, антибактериальная активность, остеопластика

**Для цитирования:** Лебединская О. В., Ковалева П. А., Черемных А. И. и др. Опыт разработки погружных изделий для остеореконструкции с эффектом памяти формы и антибактериальной активностью на основе полилактида/гидроксиапатита. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(4):77–84.  
DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-77-84>

## Experience in the development of immersible osteoarthritis devices with shape memory and antibacterial activity based on a polylactide/hydroxyapatite

Olga V. Lebedinskaya<sup>1</sup>, Polina A. Kovaleva<sup>2</sup>, Anna I. Cheremnykh<sup>2</sup>, Vladislav A. Lvov<sup>2</sup>, Polina M. Kachalina<sup>2</sup>, Tatjana S. Spirina<sup>3,4</sup>, Gulalek Babaeva<sup>3,4</sup>, Natalia V. Pashintseva<sup>5</sup>, Irina N. Kabanovskaia<sup>1</sup>, Natalia Yu. Anisimova<sup>2-4</sup>

<sup>1</sup>Academician E.A. Wagner Perm State Medical University, Ministry of Health Russia; 26 Petropavlovskaya St., Perm 614001, Russia;

<sup>2</sup>National University of Science and Technology "MISIS"; 4 Leninsky Prospekt, Moscow 119049, Russia;

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

<sup>4</sup>RUDN University; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;

<sup>5</sup>N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences; 47 Leninsky Prospekt, Moscow 119991, Russia

**Contacts:** Olga Vitalievna Lebedinskaya [lebedinska@mail.ru](mailto:lebedinska@mail.ru)

**Background.** Based on the results of evaluating the mechanical and strength characteristics and studying various aspects of biological activity, a composite material based on polylactide and hydroxyapatite (PLA/HA) is considered a promising component of shape-memory implants for osteoreconstructive surgeries.

**Aim.** To evaluate the response of laboratory animals to the implantation of PLA/HA-based implant samples, as well as the potential for their use as a platform for the local administration of antibacterial agents.

**Materials and methods.** Experimental samples were manufactured in the form of surgical staples from a PLA/HA composite material containing 15 % mass fraction of impurities by weight of hydroxyapatite in the form of 90 nm needle-shaped nanoparticles. To study biocompatibility and biodegradation *in vivo*, the staples were implanted subcutaneously in mice. After 50 days, the samples were removed, their weight changes were assessed, and histological tissue sections in the area of contact with the implants were examined. To explore the potential of using PLA/HA as a platform for local delivery of an antibacterial drug, 35 µg of an amoxicillin/clavulanic acid mixture was applied to the surface of the samples, followed by washing. The loaded samples were then placed on Mueller–Hinton agar seeded with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. After 20 hours of incubation, the presence of zones of inhibition of colony formation around the samples and disks was assessed.

**Results.** The shape memory effect was achieved by heating the samples, resulting in the closure of the initially open fixation clips. Although no significant change in sample weight was observed during their residence in the animals, histological examination of the surrounding tissue revealed signs of their initial biodegradation *in vivo*. No massive infiltration of tissue in the contact area by inflammatory cells, characteristic of an acute inflammatory response, was detected. However, isolated foreign body giant cells and isolated macrophages, lymphocytes, and neutrophils were observed in some samples. Microbiological studies demonstrated an inhibitory effect on the growth of *E. coli* and *S. aureus* colonies around the samples.

**Conclusion.** The obtained results demonstrated the biocompatibility of PLA/HA with a hydroxyapatite content of 15 % mass fraction of impurities by weight, as its implantation did not induce an acute inflammatory reaction or rejection in experimental animals. Furthermore, it was demonstrated that products made from this material can be used as a platform for the local delivery of antibacterial agents.

**Keywords:** polylactide, hydroxyapatite, shape memory effect, implant, biocompatibility, antibacterial activity, osteoplasty

**For citation:** Lebedinskaya O.V., Kovaleva P.A., Cheremnykh A.I. et al. Experience in the development of immersible osteoarthritis devices with shape memory and antibacterial activity based on a polylactide/hydroxyapatite. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(4):77–84. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-4-77-84>

### Введение

Разработка и получение новых материалов являются одними из ключевых факторов развития медицинской отрасли, что обеспечивает прогресс в создании более безопасных и multifункциональных медицинских изделий. В частности, согласно опу-

бликованным данным, большим потенциалом в этой области обладает полилактид (ПЛА) — биосовместимый биodeградируемый полимер с эффектом памяти формы [1]. В настоящее время полилактид используется как биodeградируемый шовный материал [2]. Однако в ряде исследований он был охарактеризован

как обладающий гидрофобными свойствами [2–4], что может замедлять процесс клеточной пролиферации и, следовательно, заживление хирургической травмы. В частности, в работе S. Plavenil и соавт. приводятся данные о дозозависимом снижении уровня клеточной пролиферации под влиянием ПЛА с увеличивающейся концентрацией с 25 до 100 % [5]. Для того чтобы увеличить востребованность ПЛА в качестве материала для остеореконструктивных операций, было предложено для упрочнения вводить в ПЛА гидроксиапатит (ГА) или диоксид кремния [6]. В ходе предыдущих исследований *ex vivo* нами продемонстрирована перспективность применения композиционного материала на основе ПЛА, содержащего 15 % ГА (ПЛА/ГА), в качестве основы для имплантатов с эффектом памяти формы, предназначенных для использования в ортопедии и артродеза [7, 8]. В экспериментах *in vitro* нам удалось доказать, что добавление в ПЛА ГА (в концентрации 15 % массовой доли примесей) улучшило реализуемость эффекта памяти формы, не ухудшая биосовместимости материала, однако не получены доказательства сохранения этих качеств в условиях эксперимента *in vivo*. Кроме того, важным дополнительным требованием к имплантируемым изделиям для остеореконструкции является их многофункциональность и биологическая активность.

В качестве одного из важнейших качеств, которое могло бы стать важным конкурентным преимуществом инновационного изделия для восстановления дефектов опорно-двигательного аппарата, рассматривается наличие антибактериальной активности или способность выполнять роль платформы для локальной доставки и контролируемого пролонгированного высвобождения антибактериального препарата для снижения риска развития бактериальной пленки на поверхности имплантата и гнойно-септических осложнений в постоперационный период [9]. В исследовании M. Vil и соавт. описаны свойства подобных мультифункциональных композитов на основе полиуретана с содержанием ГА в диапазоне 3,5–10 % массовой доли примесей, сочетающих контролируемое высвобождение лекарственного средства и эффект памяти формы [10]. По мнению упомянутых авторов, полученные результаты, показавшие продолжительное высвобождение лекарственного средства в течение 2 нед, подтверждают высокий потенциал применения подобных материалов в медицине. Сходный по своим свойствам аморфный полимер, демонстрирующий эффект памяти формы в сочетании с биоразлагаемостью и контролируемым высвобождением лекарственного средства, был описан и в работе других исследователей, констатировавших актуальность разработки подобных материалов [11].

**Цель нашего исследования** — оценка характера реакции организма лабораторных животных на имплантацию образцов изделий на основе ПЛА/ГА, а также перспективы их использования в качестве платформы для локального введения антибактериальных средств.

Изделия выполнены в виде хирургических скоб для фиксации краев раны при ушивании тканей. Выбор именно такой формы изделий был продиктован попыткой использовать эффект памяти формы для замыкания концов скоб под влиянием теплового воздействия без помощи специального хирургического степлера.

### Материалы и методы

Экспериментальные образцы хирургических скоб были изготовлены из композиционного материала ПЛА/ГА с содержанием ГА 15 % массовой доли примесей в виде игольчатых наночастиц 90 нм. Технологический процесс производства включал этапы получения композиционного материала методом экструзии при помощи двухшнекового микрокомпаундера НААКЕ MiniLab II (Thermo Fisher Scientific, США), в процессе которого происходило смешивание и гомогенизация компонентов при температуре 180 °С в течение 20 мин. На выходе формировался филамент для 3D-печати ( $d = 1,75$  мм). Непосредственное изготовление осуществляли на 3D-принтере Prusa i<sup>3</sup> Steel (3DiY, Россия). При печати сопло нагревали до температуры 200 °С, а стол поддерживали нагретым до температуры 60 °С. Для придания временной формы прямоугольные и округлые скобы длиной  $10 \pm 1$  мм нагревали и размыкали, сохраняя нагрузку до охлаждения материала.

Полученные образцы взвешивали, обрабатывали погружением в 60 % этиловый спирт, а затем высушивали в стерильной атмосфере. Для стимуляции эффекта памяти формы образцов их прогревали электрокоагулятором (Plasma Pen, Китай).

С целью изучения биосовместимости образцов и их биодegradации *in vivo* образцы ( $n = 5$ ) имплантировали мышам линии *Balb/c* в подкожный карман, сформированный после депиляции шерсти с дезинфекцией кожи на фоне общей анестезии. Затем раны ушивали с использованием хирургического шелка, кожу дезинфицировали. Через 50 дней животных подвергали эвтаназии, извлекали образцы скоб для оценки потери массы и готовили гистологические препараты тканей в области контакта с имплантатами. Изучение морфологии образцов производили после их фиксации в 10 % формалине и окраски гематоксилином и эозином с использованием светового микроскопа (LionHeart LX, Perkin Elmer, США). Протокол исследований на лабораторных животных был одобрен комиссией по биоэтике НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (заключение № 2025-2Н от 17.06.2025).

Для изучения перспектив использования ПЛА/ГА в качестве платформы для локальной доставки антибактериального препарата на поверхность образцов наносили раствор, содержащий 35 мкг смеси амоксициллина/клавулановой кислоты (Амоксиклав, SANDOZ, GmbH, Австрия) в фосфатно-солевом буфере («ПанЭко», Россия), высушивали в стерильной атмосфере, а затем промывали в 5 мл раствора Хенкса и повторно высушивали. Готовили взвесь 20-часовых культур *Escherichia coli* ATCC 29922 и *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 в виде дисков BD Microtrol (Becton Dickinson and Company, США) по стандарту мутности 0,5 ед. по шкале McFarland, которыми засеивали поверхность агара Мюллера–Хинтона (HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., Индия) методом газона в чашках Петри. После подсушивания на поверхности используемого агара размещали по 1 образцу ПЛА/ГА и стандартизированного диска амоксициллина/клавулановой кислоты (20 мкг/10 мкг, АМС-30, BioMerieux, Франция). Через 20 ч инкубации при температуре 37 °С оценивали наличие зон ингибирования колониеобразования вокруг образцов и дисков.

Статистический анализ результатов взвешивания образцов проводили, учитывая изменение массы образцов после извлечения из тела мышей с последующей промывкой и высушиванием, в сравнении с исходным значением после расчета медианы и значений 25 и 75 % квартилей для обоих типов образцов.

## Результаты и обсуждение

### Реализация эффекта памяти формы

Перед началом эксперимента разработанные образцы имели вид незамкнутых медицинских скоб для фиксации краев хирургической раны с острыми концами прямоугольной и округлой форм. Затем скобы локально прогревали для реализации эффекта памяти формы, что обеспечивало смыкание концов скоб. На рис. 1 показана имитация процедуры ушиба

раны после рассечения мышцы в области бедра. Мы нагревали разработанные образцы до сближения концов скоб перед началом их подкожной имплантации мышам для снижения риска травмы окружающих тканей.

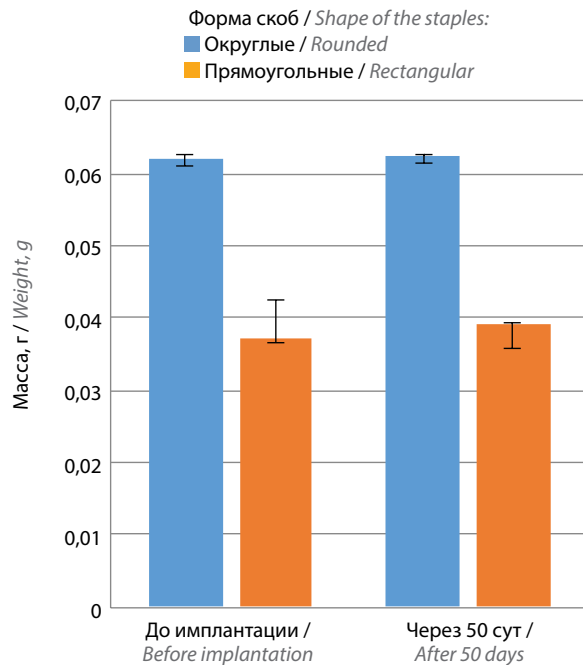
### Изменение массы образцов

Согласно полученным результатам за время нахождения в теле животного не произошло достоверного изменения массы образцов хирургических скоб (для обоих типов образцов  $p = 0,999$ ), что свидетельствует о достаточно медленной скорости их биодеградации *in vivo* (рис. 2). Сравнивая медианные значения массы образцов разной конфигурации до имплантации и после таковой, можно заметить тенденцию небольшого увеличения массы прямоугольных образцов скоб. Этот эффект уже описан ранее в работах различных авторов, исследовавших деградацию образцов на основе ПЛА. Z. Wang и соавт. проводили имплантацию образцов на основе ПЛА в мышечную ткань кроликов и сообщили о том, что изменение массы исследуемых образцов через 4 нед соответствовало примерно 2 %, через 12 нед – 5,6 %, через 20 нед – 10 %, достигая 36 % только через 36 нед наблюдения [12]. Добавление ГА в ПЛА приводило к достоверному ускорению биодеградации образцов только через 12 нед после имплантации. Аналогичное влияние ГА на кинетику биодеградации было описано в работах В. Zhang и соавт., где исследователи анализировали биодеградацию полученных методом 3D-печати (моделированием методом послойного наплавления) скаффолдов из ПЛА, содержащих 30 и 50 % наноразмерного ГА, после внутрикостной имплантации кроликам [13]. Приводятся данные об увеличении веса образцов из чистого ПЛА после 1 дня пребывания в теле экспериментального животного из-за поглощения воды и набухания. В процессе наблюдения установлено, что потеря массы



**Рис. 1.** Реализация эффекта памяти формы образцом на основе полилактида/гидроксиапатита: а – разомкнутая скоба до нагревания, исходный вид образца; б, в – фиксация концов скобы и постепенное сведение концов скобы в процессе нагревания для сближения краев раны

**Fig. 1.** Implementation of the shape memory effect by a polylactide/hydroxyapatite-based sample: a – an open staple before heating, the original appearance of the sample; б, в – fixation of the staple ends and gradual convergence of the staple ends during heating to bring the edges of the wound closer together



**Рис. 2.** Масса образцов после подкожной имплантации мышам Balb/c до 50-х суток и по их истечении

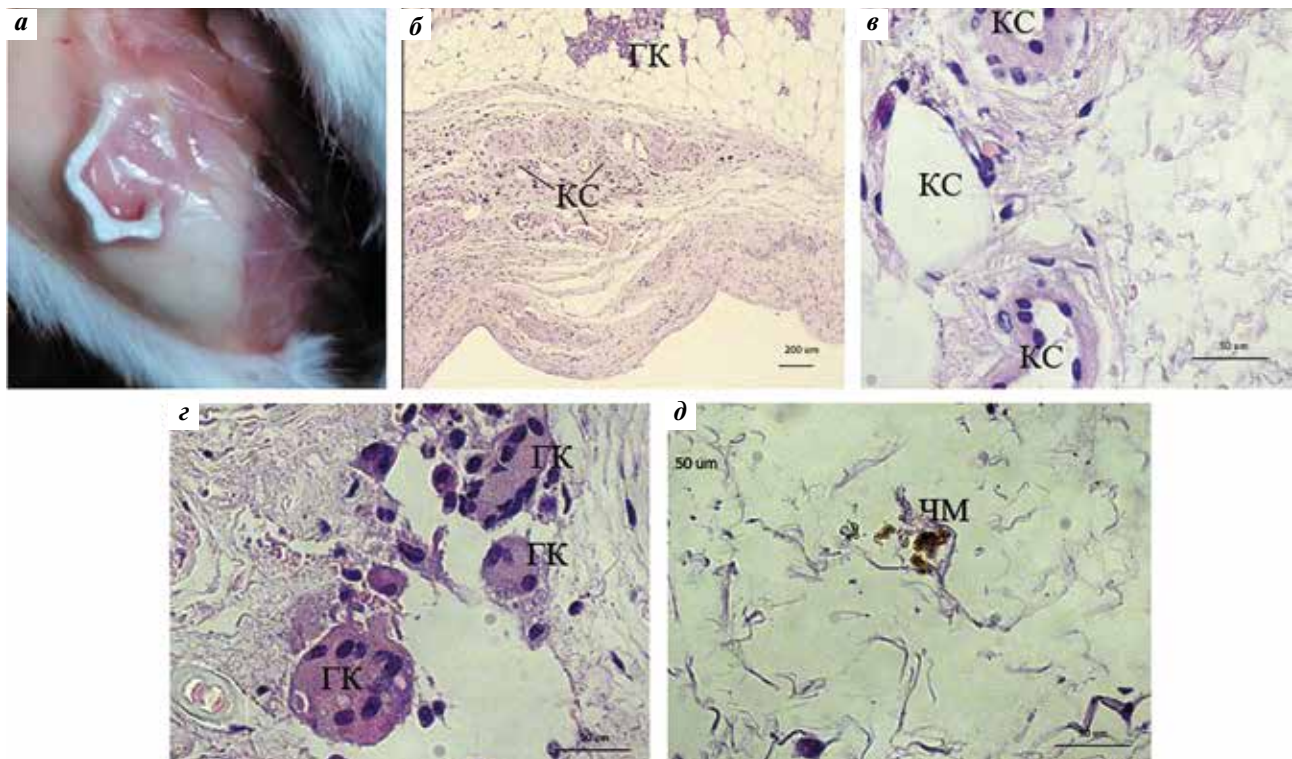
**Fig. 2.** Mass of samples after subcutaneous implantation in Balb/c mice up to the 50<sup>th</sup> day and beyond

образцами нарастала прямо пропорционально увеличению содержания в их составе ГА. Авторами сделано заключение о том, что чистый ПЛА является гидрофобным, тогда как введение ГА придает композиту гидрофильные свойства, что способствует ускорению биорезорбции.

### Морфологический анализ

Визуальный осмотр области имплантации образцов ПЛА/ГА не выявил признаков отека или воспаления. Соединительнотканная капсула плотно прилегала к поверхности образцов, фиксируя их в окружающих тканях. В соединительной ткани определялись кровеносные сосуды, в основном системы микроциркуляторного русла, при малом количестве крупных артерий и вен. При внешнем осмотре не наблюдалось признаков деструкции имплантатов, но при изучении гистологических срезов окружающих образцы тканей обнаруживались микроразмерные частицы материала, свидетельствующие о его биодеградации (рис. 3, а).

Проведенный морфологический анализ гистологических препаратов тканей, прилежащих к имплантированному образцу, показал следующее



**Рис. 3.** Внешний вид образца полилактида/гидроксиапатита после 50 сут подкожной имплантации мышцы (а) и морфология прилегающей к его поверхности соединительной ткани с кровеносными сосудами (КС) микроциркуляторного русла (б), единичными гигантскими клетками (ГК) инородных тел (в, з) и частицами материала (ЧМ) (д). Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$

**Fig. 3.** The appearance of a polylactide/hydroxyapatite sample after 50 days of subcutaneous implantation in a mouse (a) and the morphology of the connective tissue adjacent to its surface with blood vessels (КС) of the microcirculatory system (б), single giant cells (ГК) of foreign bodies (в, з) and particles of material (ЧМ) (д). Hematoxylin and eosin staining,  $\times 400$

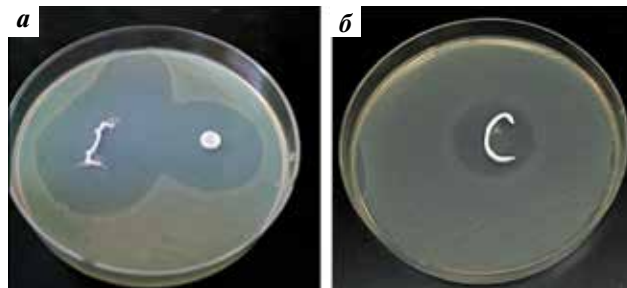
(см. рис. 3, б–д). Соединительная ткань дермы и гиподермы подкожного кармана мышцы, в который имплантировали исследуемые скобы, образует вокруг них тонкую соединительнотканную капсулу обычного строения без признаков некроза и острого воспаления, характерных для реакции отторжения, или фиброзных изменений. Коллагеновые волокна тонкие, формируют нежную сеть волокнистого компонента межклеточного вещества. В ткани имеются многочисленные фибробласты и фиброциты и только единичные макрофаги, лимфоциты, плазмоциты и нейтрофилы, не образующие массовых очагов инфильтрации. Таким образом, выявленная морфологическая картина изученных гистологических препаратов служит надежным признаком биосовместимости тканей организма и исследуемого композиционного материала на основе ПЛА/ГА.

В прилегающей к образцу ткани присутствует также разветвленная сеть сосудов микроциркуляторного русла: артериол, капилляров, венул и в меньшей степени крупных артерий и вен. В некоторых срезах наблюдается полнокровие сосудов (возможно, как результат забора материала). Очевидно, что нарастающая васкуляризация периимплантационного пространства опосредует биодеградацию образца ПЛА/ГА. Косвенным свидетельством того, что данный процесс уже реализуется, является наличие в прилегающей к образцу области подкожно-жировой клетчатки многоядерных симпластов – гигантских клеток инородных тел.

Сходная реакция в виде присутствия в тканях гигантских клеток инородных тел после имплантации ПЛА была описана в работе М. Nonhoff и соавт. [14]. Таким образом, несмотря на отсутствие видимых признаков деградации имплантатов, гистологические исследования с использованием световой микроскопии подтверждают, что биодеградация полученных нами имплантатов на основе ПЛА/ГА уже реализуется к моменту окончания эксперимента. Установленные нами факты представляют интерес, поскольку, согласно данным И.В. Майбородина и соавт., в современной научной литературе, посвященной морфологическим результатам применения полилактидов, приводятся разноречивые сведения о скорости их биологического распада и об индуцируемом ими биологическом ответе, а следовательно, и об их безопасности, что требует дальнейшего сбора исследовательских данных [15].

#### **Изучение перспективы использования образцов на основе полилактида/гидроксиапатита в качестве платформы для локальной доставки антибактериального препарата**

Как известно, высокий риск развития местных гнойных осложнений при остеосинтезе обуславливает необходимость разработки новых профилак-



**Рис. 4.** Торможение колониеобразования *Escherichia coli* (а) и *Staphylococcus aureus* (б) под воздействием образцов полилактида/гидроксиапатита, нагруженных препаратом амоксициллина/клавулановой кислоты, в сравнении с эффектом стандартизированных дисков амоксициллин/клавулановая кислота

**Fig. 4.** Inhibition of colony formation of *Escherichia coli* (а) and *Staphylococcus aureus* (б) under the influence of polylactide/hydroxyapatite samples loaded with amoxicillin/clavulanic acid mixture, in comparison with the effect of standardized amoxicillin/clavulanic acid disks

ческих и терапевтических подходов [16]. Одним из решений является разработка имплантатов с антибактериальной активностью. В настоящем исследовании мы изучили возможность модификации свойств образцов на основе ПЛА/ГА путем их нагрузки антибактериальным препаратом амоксициллина/клавулановой кислоты. Полученные данные подтвердили перспективность такого подхода. Было показано, что нагруженный препаратом образец, даже после отмывки, способен ингибировать рост микроорганизмов в области, прилегающей к поверхности образцов. Об этом свидетельствует формирование выраженных зон торможения колониеобразования бактериальных культур в экспериментах на плотных питательных средах (рис. 4). В качестве контрольного образца рядом с экспериментальными образцами на основе ПЛА/ГА в форме скоб располагали стандартизированные диски амоксициллина/клавулановой кислоты. Эти результаты показывают, что образцы на основе ПЛА/ГА могут сорбировать на своей поверхности раствор антибиотика, удерживая часть его даже после высушивания и отмывки препарата. При этом данный материал во влажной среде обеспечивает релиз антибиотика до накопления локальной эффективной действующей концентрации, подавляющей бактериальный рост в контактной области. С учетом ранее опубликованных данных результаты настоящего исследования позволяют рассматривать ПЛА/ГА в качестве перспективной платформы для локальной доставки антибактериальных средств в организм и получения имплантируемых конструкций с эффектом памяти формы для остеосинтеза и артродеза с антибактериальной активностью [7, 8].

#### **Заключение**

Полученные в настоящем исследовании результаты доказали биосовместимость композиционного

материала ПЛА/ГА с содержанием ГА 15 % массовой доли примесей, поскольку его имплантация не индуцировала развития острой реакции воспаления или отторжения у экспериментальных животных. Кроме того, показано, что изделия из данного материала могут быть использованы в качестве платформы для локальной доставки лекарственных препаратов, что позволило обеспечить реализацию экспериментальными образцами антимикробного

эффекта. Эти факты в сочетании с медленной скоростью биодеградации, а также эффектом памяти формы позволяют рассматривать полученные экспериментальные образцы на основе ПЛА/ГА как перспективные для применения в клинической практике ортопедии, где проведение хирургических операций часто характеризуется как трудным оперативным доступом, так и высоким риском развития местных гнойных осложнений.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Wei Zh., Long Ch., Yu Zh. Surprising shape-memory effect of polylactide resulted from toughening by polyamide elastomer. *Polymer* 2009;50(5):1311–5. DOI: 10.1016/j.polymer.2009.01.032
- Alhulaybi Z.A. Fabrication and characterization of poly(lactic acid)-based biopolymer for surgical sutures. *Chem Engineering* 2023;7:98. DOI: 10.3390/chemengineering7050098
- Tümer E.H., Erbil H.Y., Akdoğan N. Wetting of superhydrophobic polylactic acid micropillared patterns. *Langmuir* 2022;38(32):10052–64. DOI: 10.1021/acs.langmuir.2c01708
- Aworinde A.K., Adeosun S.O., Oyawale F.A. et al. Comparative effects of organic and inorganic bio-fillers on the hydrophobicity of polylactic acid. *Results in Engineering* 2020;5:100098. DOI: 10.1016/j.rineng.2020.100098
- Havenil S., Kim D.H., Valan A. et al. Phenyllactic acid from *Lactobacillus plantarum* promotes adipogenic activity in 3T3-L1 adipocyte via up-regulation of PPAR- $\gamma$ 2. *Molecules* 2015;20:15359–73. DOI: 10.3390/molecules200815359
- Senatov F.S., Zadorozhnyy M.Yu., Niaza K.V. et al. Shape memory effect in 3D-printed scaffolds for self-fitting implants. *Eur Polym J* 2017;93(4):222–31. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2017.06.011
- Качалина П.М., Ковалева П.А., Черемных А.И. и др. Биологические аспекты применения композиционных материалов на основе полилактида в ортопедии. *Российский биотерапевтический журнал* 2025;24(1):78–86. DOI: 10.17650/1726-9784-2025-24-1-78-86  
Kachalina P.M., Kovaleva P.A., Cheremnykh A.I. Expression of transferrin receptor CD 71 correlates with expression of adhesion molecules ICAM-1 in breast cancer cells. *Rossiiskij bioterapevticeskij zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2025;24(1):78–86. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2025-24-1-78-86
- Анисимова Н.Ю., Корнюшенков Е.А., Гаранин Д.В. и др. Прикладные аспекты разработки имплантатов с памятью формы для артродеза. *Российский ветеринарный журнал* 2025;1:6–13. DOI: 10.32416/2500-4379-2025-1-6-13  
Anisimova N.Yu., Korniyushenkov E.A., Garanin D.V. et al. Applied aspects of the development of shape memory implants for arthrodesis. *Rossiiskiy veterinarnyy zhurnal = Russian Veterinary Journal* 2025;1:6–13. (In Russ.). DOI: 10.32416/2500-4379-2025-1-6-13
- Caplin J.D., García A.J. Implantable antimicrobial biomaterials for local drug delivery in bone infection models. *Acta Biomater* 2019;93:2–11. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.01.015
- Bil M., Heljak M., Swieszkowski W. Development of drug-releasing shape-memory polyurethane/hydroxyapatite composites – smart biomaterial for bone tissue implants. *Front Bioeng Biotechnol* 2016;4. Conference Abstract: 10<sup>th</sup> World Biomaterials Congress. DOI: 10.3389/conf.FBIOE.2016.01.00732
- Kim J.O., Kabanov A.V., Bronich T.K. Polymer micelles with cross-linked polyanion core for delivery of a cationic drug doxorubicin. *J Control Release* 2009;138(3):197–204. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.04.019
- Wang Z., Wang Y., Ito Y. et al. A comparative study on the *in vivo* degradation of poly(L-lactide) based composite implants for bone fracture fixation. *Sci Rep* 2016;6:20770. DOI: 10.1038/srep20770
- Zhang B., Wang L., Song P. et al. 3D printed bone tissue regenerative PLA/HA scaffolds with comprehensive performance optimizations. *Materials & Design* 2021;201(1):109490. DOI: 10.1016/j.matdes.2021.109490
- Nonhoff M., Puetzler J., Hasselmann J. et al. The potential for foreign body reaction of implanted poly-L-lactic acid: a systematic review. *Polymers (Basel)* 2024;16(6):817. DOI: 10.3390/polym16060817  
Майбородин И.В., Кузнецова И.В., Шевела А.И. и др. Тканевые реакции при использовании имплантатов из полимеров молочной кислоты. *Морфология* 2014;146(4):78–89. DOI: 10.17816/morph.398790  
Mayborodin I.V., Kuznetsova I.V., Shevela A.I. et al. Tissue reactions when using lactic acid polymer implants. *Morfologiya = Morphology* 2014;146(4):78–89. DOI: 10.17816/morph.398790
- Ткаченко А.Н., Эльсан-Уль-Хак, Корнеев А.А. и др. Прогноз инфекционных осложнений в зоне операции при металлоостеосинтезе длинных трубчатых костей. *Политравма* 2018;1(11):17–25.  
Tkachenko A.N., Elsan-Ul-Haq, Korneev A.A. et al. Prognosis of infectious complications in surgical site after osteosynthesis of long bones. *Polytrauma* 2018;1(11):17–25.

**Вклад авторов**

О.В. Лебединская: морфологические исследования, написание текста рукописи;  
П.А. Ковалева, А.И. Черемных: анализ полученных данных, написание текста рукописи;  
В.А. Львов: получение образцов полилактида и гидроксиапатита для анализа, пробоподготовка;  
П.М. Качалина: анализ свойств образцов полилактида и гидроксиапатита;  
Т.С. Спирина: исследование антибактериальных свойств полилактида и гидроксиапатита;  
Г. Бабаева: проведение исследований *in vivo*;  
Н.В. Пашинцева, И.Н. Кабановская: подготовка и анализ гистологических препаратов;  
Н.Ю. Анисимова: разработка дизайна исследования, редакция текста рукописи.

**Author's contributions**

O.V. Lebedinskaya: morphological studies, manuscript writing;  
P.A. Kovaleva, A.I. Cheremnykh: analysis of the obtained data, manuscript writing;  
V.A. Lvov: polylactide and hydroxyapatite sample preparation and preparation;  
P.M. Kachalina: analysis of polylactide and hydroxyapatite sample properties;  
T.S. Spirina: antibacterial properties study of polylactide and hydroxyapatite;  
G. Babaeva: *in vivo* studies;  
N.V. Pashintseva, I.N. Kabanovskaia: preparation and analysis of histological specimens;  
N.Yu. Anisimova: study design, manuscript editing.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

О.В. Лебединская / O.V. Lebedinskaya: <https://orcid.org/0000-0002-3837-3780>  
П.А. Ковалева / P.A. Kovaleva: <https://orcid.org/0000-0002-7046-173X>  
А.И. Черемных / A.I. Cheremnykh: <https://orcid.org/0000-0001-8980-3755>  
В.А. Львов / V.A. Lvov: <https://orcid.org/0000-0001-5626-3932>  
П.М. Качалина / P.M. Kachalina: <https://orcid.org/0009-0008-4344-7757>  
Т.С. Спирина / T.S. Spirina: <https://orcid.org/0000-0001-7631-3116>  
Г. Бабаева / G. Babaeva: <https://orcid.org/0000-0001-5781-7925>  
Н.В. Пашинцева / N.V. Pashintseva: <https://orcid.org/0009-0004-8323-8213>  
И.Н. Кабановская / I.N. Kabanovskaia: <https://orcid.org/0009-0007-1323-6206>  
Н.Ю. Анисимова / N.Yu. Anisimova: <https://orcid.org/0000-0002-4370-6578>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-23-00442).

**Funding.** The study was conducted with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 24-23-00442).

**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. Протокол исследования одобрен комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» (заключение № 2025-2Н от 17.06.2025).

**Compliance with principles of bioethics.** The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. The experimental protocol was approved at a meeting of the Bioethics Commission of the N.N. Blokhin National Medical Research Oncology Center (conclusion No. 2025-2H dated 17.06.2025).

Статья поступила: 27.09.2025. Принята к публикации: 28.10.2025. Опубликовано онлайн: 10.12.2025.

Article submitted: 27.09.2025. Accepted for publication: 28.10.2025. Published online: 10.12.2025.