

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФАРМАКОЛОГИИ ИМЕНИ В. В. ЗАКУСОВА»

На правах рукописи

КОРЖОВА КСЕНИЯ ВИТАЛЬЕВНА

**ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ, ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВ-
НОСТЬ И АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ 5-
ОКСИПИРИМИДИНА И ИХ КОМБИНАЦИЙ С ДОКСОРУБИЦИНОМ**

3.3.6 –фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Коваленко Лариса Петровна

МОСКВА–2022

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1	10
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Микроокружение опухоли.....	10
1.2 Рак шейки матки.....	16
1.3 Рак легкого.....	20
1.4 Интерлейкин-4.....	23
1.5 Интерлейкин-6.....	26
1.6 Семейство интерлейкина-17.....	29
1.7 Интерлейкин-10.....	31
1.8 Пиримидины.....	33
Глава 2	38
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
2.1 Экспериментальные животные.....	38
2.2 Опухолевые клеточные линии и штаммы.....	38
2.3 Исследуемые агенты.....	38
2.4 Препараты для верификации используемых моделей.....	39
2.5 Материалы.....	39
2.6 Иммунофармакологические методы.....	40
2.6.1 Исследование гуморального иммунного ответа в реакции пассивной гемагглютинации на тимусзависимый антиген (эритроциты барана).....	40
2.6.2 Исследование клеточного иммунного ответа в реакции гиперчувствительности замедленного типа.....	41
2.6.3 Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов.....	42
2.6.4 Определение массы и концентрации ядросодержащих клеток органов иммунной системы.....	42
2.6.5 Оценка генерации активных форм кислорода методом люминол-зависимой клеточной хемилюминесценции.....	43
2.7 Методы исследования противовоспалительной и противоаллергенной активности соединений.....	44
2.7.1 Острый экссудативный отек на каррагенан у крыс.....	44
2.7.2 Реакция воспаления на конканавалин А.....	45
2.7.3 Изучение противоаллергенной активности соединений методом реакции общей анафилактики на овальбумин в опытах на морских свинках альбиносах.....	45
2.8 Методы оценки противоопухолевой и антиметастатической активности соединений.....	46

2.8.1 Модель злокачественной перевиваемой эпидермоидной карциномы легкого Lewis (LLC) in vivo	46
2.8.2 Оценка противоопухолевой активности соединений в модели злокачественной перевиваемой эпидермоидной карциномы легкого Lewis (LLC)	47
2.8.3 Модель злокачественной перевиваемой опухоли рака шейки матки РШМ-5 in vivo ..	48
2.8.4 Оценка противоопухолевой активности соединений в модели злокачественной перевиваемой опухоли рака шейки матки РШМ-5.	48
2.8.5 Мультиплексное исследование цитокинов в сыворотке крови у животных-опухоленосителей в модели рака шейки матки РШМ-5 методом проточной цитометрии....	49
2.8.6 Оценка антиметастатических свойств в модели перевиваемой эпидермоидной карциномы легкого Lewis (LLC) при удалении первичного опухолевого узла	49
2.8.7 Мультиплексное исследование цитокинов в сыворотке крови у животных-опухоленосителей в модели эпидермоидной карциномы легкого Lewis на фоне удаления первичного опухолевого узла методом проточной цитометрии	51
2.9 Статистическая обработка результатов	52
Глава 3	54
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	54
3.1 Оценка иммунофармакологических свойств производных 5-оксипириимидина СНК-411 и СНК-578.....	54
3.1.1 Исследование гуморального иммунного ответа в реакции пассивной гемагглютинации на тимусзависимый антиген (эритроциты барана).....	54
3.1.2 Исследование клеточного иммунного ответа в реакции гиперчувствительности замедленного типа	56
3.1.3 Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов	56
3.1.4 Определение массы и концентрации ядросодержащих клеток органов иммунной системы.....	57
3.1.5 Оценка генерации активных форм кислорода методом люминол-зависимой клеточной хемилюминесценции.....	58
3.2 Оценка противовоспалительной и противоаллергенной активности соединений СНК-411 и СНК-578.....	58
3.2.1 Острый экссудативный отек на каррагенан у крыс.....	58
3.2.2 Реакция воспаления на конканавалин А.....	60
3.2.3 Изучение противоаллергенной активности соединений методом реакции общей анафилаксии на овальбумин в опытах на морских свинках альбиносах	61
3.3 Оценка противоопухолевой и антиметастатической активности соединений СНК-411 и СНК-578.....	62
3.3.1 Оценка противоопухолевой активности соединений в модели злокачественной перевиваемой опухоли LLC	62
3.3.2 Оценка противоопухолевой активности соединений в модели злокачественной перевиваемой опухоли рака шейки матки РШМ-5	66

3.3.3 Мультиплексное исследование цитокинов в сыворотке крови у животных-опухоленосителей в модели рака шейки матки РШМ-5 методом проточной цитометрии....	67
3.3.4 Оценка антиметастатических свойств в модели перевиваемой опухоли LLC при удалении первичного опухолевого узла.....	69
3.3.5 Мультиплексное исследование цитокинов в сыворотке крови у животных-опухоленосителей в модели эпидермоидной карциномы легкого Lewis на фоне удаления первичного опухолевого узла методом проточной цитометрии.....	71
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	74
ВЫВОДЫ.....	85
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	86
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	87
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	91

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. По прогнозам ВОЗ в течение последующих 20 лет число онкологических заболеваний вырастет на 60%, к 2040 году число новых случаев рака в год увеличится до 37 млн, при этом самые высокие показатели будут зарегистрированы в странах с невысоким социально-экономическим уровнем.

Классическими методами лечения онкологических больных являются лучевая терапия, хирургическое лечение и химиотерапия. Комбинации препаратов первой и второй линии химиотерапии опухолей ежегодно анализируются и в ряде случаев меняются, однако в последнее время повышения эффективности традиционных методов лечения не наблюдается. У значительной части пациентов опухоль обнаруживают на поздних стадиях заболевания, на фоне уже запущенного процесса метастазирования, когда эффективность всех существующих современных методов лечения резко снижается.

Установлено, что 20-25% всех онкологических заболеваний возникает в связи с хроническими инфекциями и хроническим воспалением [123], что характеризуется высокой концентрацией проонкогенных цитокинов в микроокружении опухоли. Воспаление играет важную роль в развитии опухолевого процесса, влияя на иммунный надзор на разных стадиях опухолеобразования, включая иницирование роста опухоли и метастазирование [132]. В последние годы накоплены данные о механизмах избегания опухолевыми клетками иммунного надзора, которые способствуют развитию злокачественного новообразования и дальнейшему метастазированию. На сегодняшний день фундаментальные исследования в экспериментальной и клинической онкологии в основном направлены на поиск характерных особенностей раковой клетки с целью обнаружить мишени для противоопухолевой иммунотерапии, особое внимание уделяется изучению эффективности ингибиторов иммунных контрольных точек (ИИКТ) – анти-CTLA-4, анти-PD1-моноклональных антител и других таргетных препаратов. Однако большинство высокомолекулярных таргетных препаратов обладают выраженным побочным действием, в том числе вызывают реакции гиперчувствительности [221], и, кроме того, быстро теряют свою эффективность в лечении онкозаболеваний [180].

Это актуализирует поиск новых малотоксичных противоопухолевых и антиметастатических соединений, активирующих противоонкогенные механизмы иммунной защиты, оптимизирующих содержание и функциональную активность натуральных киллеров и Т-цитотоксических лимфоцитов, а также снижающих содержание проонкогенных, провоспалительных цитокинов [105;248], ассоциированных с опухолевым ростом, в частности плеiotропного IL-4, участие которого обязательно также в синтезе IgE, ответственного за развитие ана-

филаксии и других реакций гиперчувствительности немедленного типа, и провоспалительного IL-6.

В ранее проведенных исследованиях [40] показано, что синтезированное в ФБГНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» производное 5-оксипиридина - СНК-411 понижало содержание Th2-цитокинов – плейотропного IL-4, провоспалительного IL-6 в сыворотке крови мышей-опухоленосителей C57BL/6 с LLC. Были определены перспективы дальнейшего изучения соединения СНК-411 и его хлоргидрата СНК-578.

Степень разработанности проблемы.

В ФБГНУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова» был проведен скрининг производных 5-оксипиримидинов и 3-оксипиридинов, и отобрано и запатентовано соединение СНК-411 (2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиридин) [70], продемонстрировавшее выраженные иммунофармакологические, противовоспалительные, противоопухолевые и антиметастатические свойства на различных моделях [29;37-40]. Также было показано, что при совместном применении СНК-411 с доксорубицином наблюдалось усиление цитотоксического эффекта, позволяющее на порядок снизить концентрацию высокотоксичного доксорубицина [39], что обусловило дальнейшее изучение производных 5-оксипиридина в комбинации с доксорубицином.

Недостатком соединения СНК-411 является его плохая растворимость, в связи с чем был произведен синтез хорошо растворимого в воде хлоргидрата СНК-411, соединения СНК-578 (хлоргидрат 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиридина), которое также было запатентовано [28], и поставлена цель сравнительного исследования соединений СНК-411 и СНК-578 отдельно или в комбинации с доксорубицином на противоопухолевую, антиметастатическую и противовоспалительную активности.

Цель исследования. Целью данной работы являлась оценка противоопухолевой, противовоспалительной и антиметастатической активности СНК-411 и СНК-578 и их комбинаций с доксорубицином.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

Задачи исследования.

1. Исследовать влияние СНК-578 отдельно и в комбинации с доксорубицином на основные показатели неспецифического, гуморального и клеточного иммунного ответа в опытах на мышях линий СВА, C57BL/6 и гибридах F₁(СВА×С57BL/6) и сопоставить их с результатами ранее проведенных исследований иммунофармакологической активности СНК-411.
2. Определить противовоспалительную активность СНК-578 на моделях острого экссудативного воспаления: отека лапы на каррагенан у аутбредных самцов крыс, реакции воспаления на Конканавалин А (Кона) у мышей самцов линии СВА; сравнить их с

результатами ранее проведенных исследований противовоспалительной активности СНК-411.

3. Исследовать противоаллергенную активность СНК-411 и СНК-578 в опытах на самцах морских свинок-альбиносов на модели общей системной анафилаксии к овальбумину.
4. Оценить влияние курсового введения СНК-411 и СНК-578 на рост опухоли на модели рака шейки матки (РШМ-5) в опытах на самках мышей линии СВА.
5. Методом проточной цитометрии определить содержание цитокинов, ассоциированных с опухолевым ростом, в сыворотке крови животных-опухоленосителей, на модели рака шейки матки (РШМ-5) в опытах на самках мышей линии СВА.
6. Исследовать противоопухолевую активность и выживаемость после курсового введения СНК-411 и СНК-578 и в комбинации с доксорубицином на модели эпидермоидной карциномы легкого Lewis (LLC) в опытах на мышах самцах линии C57Bl/6.
7. Оценить антиметастатическую активность курсового введения СНК-411 и СНК-578 и в комбинации с доксорубицином у животных-опухоленосителей LLC в опытах на самцах мышей линии C57BL/6 после удаления первичного опухолевого узла.
8. Методом проточной цитометрии определить содержание цитокинов, ассоциированных с опухолевым ростом, в сыворотке крови животных-опухоленосителей LLC в опытах на самцах мышей линии C57BL/6 после удаления первичного опухолевого узла.

Научная новизна. Впервые были исследованы иммунофармакологические, противовоспалительные, противоопухолевые и антиметастатические свойства соединения СНК-578, выявлена или подтверждена аналогичная активность соединения СНК-411.

На моделях реакции воспаления на Кона и каррагенан впервые установлены выраженные противовоспалительные свойства СНК-578 в дозе 10 мг/кг, сопоставимые с диклофенаком, и подтверждены у соединения СНК-411 в дозах 10 - 50 мг/кг. Впервые установлено подавление реакции анафилаксии на овальбумин под влиянием соединений СНК-411 в дозе 50 мг/кг и СНК-578 в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг. Выявлено, что соединение СНК-578 в отличие от СНК-411 не стимулировало гуморальное звено иммунитета, в комбинации с доксорубицином значительно подавляло антителообразование, снижало массу и клеточность тимуса, а монотерапия СНК-578 приводила к снижению клеточности селезенки и тимуса.

Впервые обнаружены выраженные противоопухолевые свойства СНК-578 и СНК-411 на модели рака шейки матки РШМ-5: СНК-578 ингибировало рост массы опухоли на 86,5%. СНК-411 подавляло уровни проонкогенного цитокина IL-17A и IL-10, СНК-578 – IL-6, IL-10 и

IL-17A. На концентрацию IFN- γ производные 5-оксипиридина не оказывали подавляющего действия.

Впервые выявлены противоопухолевые и антиметастатические свойства соединения СНК-578 на модели LLC. СНК-578 ингибировало рост объема опухоли на 72,2%. После удаления первичного опухолевого узла – соединение СНК-578 в дозе 10 мг/кг и в комбинации с доксорубицином подавляло процесс метастазирования. СНК-411 подавляло процесс метастазирования в дозе 25 мг/кг. СНК-411 и СНК-578 снижали содержание провоспалительных и проонкогенных Th2 цитокинов IL-4, IL-5, IL-6 и не оказывали негативного влияния на противовирусный и противоопухолевый Th1 цитокин IFN- γ .

Теоретическая и практическая значимость работы. Определены направления поиска соединений с противовоспалительными, противоаллергенными, противоопухолевыми и антиметастатическими свойствами в ряду производных 5-оксипиридина. Изученные производные 5-оксипиридина соединения СНК-411 и СНК-578 определены как перспективные для разработки в качестве средств противоопухолевой иммунотерапии.

Положения, выносимые на защиту.

1. СНК-578 в дозах 10 мг/кг и 25 мг/кг не стимулирует гуморальное звено иммунитета и фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов, в комбинации с доксорубицином подавляет антителообразование у мышей. СНК-578 в дозе 10 мг/кг повышает клеточный иммунный ответ. СНК-578 в дозе 10 мг/кг снижает клеточность селезенки, в дозе 25 мг/кг – клеточность селезенки и тимуса.
2. СНК-578 в дозах 10-50 мг/кг проявляет выраженные противовоспалительные и противоаллергенные свойства на моделях воспаления у мышей, крыс и аллергического воспаления на модели общей системной анафилаксии у морских свинок. СНК-411 проявляет противоаллергенную активность в дозе 50 мг/кг.
3. СНК-578 и СНК-411 вызывают выраженное торможение роста опухоли рака шейки матки (РШМ-5) у мышей. СНК-411 подавляет уровни проонкогенных цитокинов IL-10 и IL-17A в сыворотке крови мышей-опухоленосителей. СНК-578 подавляет уровни IL-6, IL-10 и IL-17A. На уровень Th1-цитокина IFN- γ производные 5-оксипиридина подавляющего действия не оказывают.
4. СНК-578 и СНК-411 в дозах 10-25 мг/кг обладают противоопухолевой активностью на модели перевиваемой LLC с первичным опухолевым узлом у мышей. СНК-578 увеличивает продолжительность жизни мышей-опухоленосителей.
5. СНК-578 в дозе 10 мг/кг и в комбинации с доксорубицином обладает антиметастатическими свойствами и увеличивает продолжительность жизни мышей на фоне удаления первичного опухолевого узла перевиваемой LLC. СНК-411 подавляет метастазирование

и увеличивает продолжительность жизни в дозе 25 мг/кг. СНК-578 и СНК-411 снижают содержание Th2 цитокинов IL-4, IL-5, IL-6 в сыворотке крови мышей-опухоленосителей, не подавляя содержание Th1 цитокина IFN- γ на фоне удаления первичного опухолевого узла LLC.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов всех исследований подтверждается адекватными методами статистического анализа и повторами серий опытов. Результаты диссертационной работы доложены на V съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств» (Ярославль, 2018), Всероссийской научной конференции молодых ученых «Достижения современной фармакологической науки» (Рязань, 2019), Всероссийской конференции с международным участием по медицинской химии «MedChem Russia» (Екатеринбург, 2019), XXVII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2020), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Клиническая и экспериментальная фармакология: достижения в науке, практике, образовании» (Курск, 2021), II конференции молодых ученых (Москва, 2021). Основные положения диссертационной работы были представлены на программе «РакФонд» при поддержке компании «СайСторЛаб» (Сколково).

Личный вклад автора состоит в выполнении экспериментальной и аналитической части диссертации, автором проведена обработка и интерпретация полученных данных. При участии автора также были подготовлены публикации по результатам диссертационной работы.

Связь темы диссертационной работы с планом научных работ учреждения. Диссертационная работа выполнена согласно плану научно-исследовательской работы ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» по теме «Фармакологическое предупреждение генотоксических эффектов при воздействии средовых факторов и в моделях патологических состояний» (Рег.№ 0521-2019-0004).

Сведения о публикациях по теме диссертации. Результаты исследований опубликованы в 10 печатных работах, из них 4 статьи в журналах из перечня рецензируемых научных журналов, определенных ВАК Минобрнауки РФ, 6 тезисов в материалах российских и международных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 117 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов экспериментов, их обсуждения, выводов и списка литературы. Иллюстрирована 16 таблицами и 22 рисунками. Библиографический указатель включает 89 отечественных и 183 иностранных источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Одними из самых значимых факторов развития онкологических заболеваний является курение и воздействие промышленных атмосферных выбросов на организм, а также генетическая предрасположенность. С возрастом заболеваемость онкологией сильно возрастает в связи с накоплением факторов риска развития определенных раковых заболеваний. Примерно в трети случаев смерть от рака обусловлена четырьмя основными источниками риска, связанными с поведением и рационом питания: высокий индекс массы тела, низкий уровень потребления фруктов и овощей, отсутствие физической активности, употребление табака и алкоголя.

Согласно последнему отчету Всемирной Организации Здравоохранения к 2030 году количество новых случаев заболевания раком возрастёт примерно на 70%. Ежегодно рак диагностируется у 14 млн человек, но, как предполагается, к 2025 году эта цифра достигнет 19 млн в год, 22 млн к 2030 году и 24 млн к 2035 году. Количество смертей от онкологических заболеваний возрастёт до 13 миллионов в год.

1.1. Микроокружение опухоли

Злокачественная опухоль представляет собой не только новообразование из непосредственно опухолевых клеток, но и его клеточное микроокружение, состоящего из иммунцитов различного генеза, которые влияют на развитие и рост опухоли, ангиогенез, метастазирование, матриксное ремоделирование и уклонение от иммунного ответа [100;270]. С помощью проточной цитометрии в опухолях были обнаружены множественные типы иммунных клеток, проявляющих иммуносупрессивную активность и способствующих развитию злокачественных новообразований, включая регуляторные Т-клетки (Tregs), незрелые моноциты (iMCs), альтернативно активированные макрофаги (TAMs), тучные клетки, нейтрофилы, моноциты, дендритные клетки (DC) и Th2-хелперы [226]. Одним из факторов развития иммунного микроокружения опухоли, определяющим развитие заболевания в соответствии с концепцией иммуноредактирования [114], является гипоксия, которая вызывает экспрессию фактора транскрипции HIF (hypoxia inducible factor) [7;193].

Была предложена трехфазная концепция “три E” (elimination, equilibrium, escape) (рисунок 1): фаза элиминации, фаза равновесия и ускользания (избегания). В фазе элиминации клетки врожденной и адаптивной иммунной системы совместно обнаруживают и уничтожают единичные опухолевые клетки, прежде чем они станут клинически очевидными (по данной причине особенности стадии изучены только в экспериментах). Такие опухолевые клетки являются иммуногенными, экспрессирующими антигены, которые отличают их от нормальных клеток. Раковые клетки, которые переживают фазу элиминации, входят в фазу равновесия, в которой

иммунная система удерживает опухоль в состоянии покоя. Это самая длинная фаза процесса иммуноредактирования рака, которая может длиться в течение всей жизни пациента. Некоторые опухолевые клетки претерпевают генетические и эпигенетические изменения, и в дальнейшем противостоят распознаванию иммунитетом. На этом этапе существует баланс между противоопухолевыми и опухолевыми цитокинами. Наблюдается медленное, постепенное увеличение объема опухоли, которая клинически уже обнаруживается. Во время фазы ускользания (избегания) опухолевые клетки проявляют иммуносупрессивные свойства за счет продукции цитокинов и факторов роста, а также за счет рекрутирования иммуносупрессивных клеток, что приводит к ухудшению работы эффекторных Т-клеток [100]. На уровне опухолевых клеток продолжают происходить изменения, приводящие к снижению иммунного распознавания (например, к потере антигенов) или повышению устойчивости к цитотоксическим эффектам иммунитета (например, посредством индукции антиапоптотических механизмов, включающих постоянную активацию проонкогенных факторов транскрипции, таких как как STAT3, или экспрессия антиапоптотических эффекторных молекул, таких как BCL-2), которые способствуют росту опухоли [190;224]. Конечным результатом является отбор слабоиммуногенных вариантов опухолевых клеток, обладающих повышенной устойчивостью, выживаемостью, иммуносупрессией и ангиогенезом, и которые далее индуцируют образование новых иммуносупрессивных клеток (например, регуляторных Т-клеток и миелоидных клеток-супрессоров) и цитокинов [100;270]. Характерная черта фазы ускользания – интенсивный рост опухоли и активация процессов ангиогенеза.

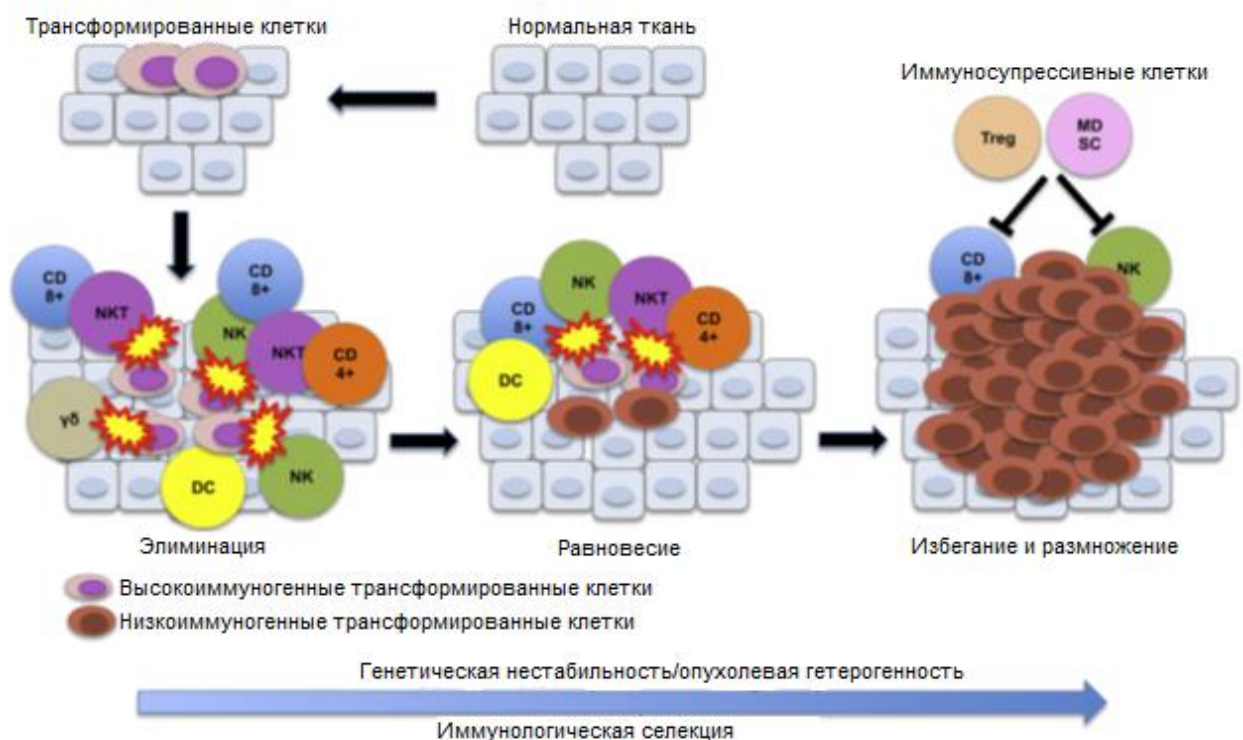


Рисунок 1. Процесс иммуноредактирования опухоли [100].

В большинстве онкологических заболеваний наблюдается переключение иммунных ответов Т-хелперных клеток с Th1-пути на Th2, при этом в опухолевых тканях определяется низкая продукция Th1-цитокинов (IFN- γ , IL-2, TNF- α) и высокая продукция цитокинов Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13, TGF- β), что свидетельствует о подавленном противоопухолевом иммунитете и стимуляции опухоль-ассоциированных макрофагов [190;231]. Th2-клетки также играют важную роль в аллергии и секреции гистамина, серотонина и лейкотриенов базофилами и тучными клетками [82]: IL-4 способствует дифференцировке В-клеток в плазматические клетки и, вместе с IL-13, стимулирует синтез IgE [13;16]. Увеличение синтеза IgE в ответ на стимуляцию IL-4 приводило к усилению IgE-стимулированного синтеза цитокинов тучными клетками, способными вырабатывать IL-4, IL-5, IL-6. Как было показано, блокада передачи сигналов IL-4 или его рецептором IL-4R α уменьшала поляризацию макрофагов к фенотипу опухоль-ассоциированных, тем самым уменьшая метастазирование в легких [99;135]. Однако существуют Т-хелперы 0 типа (Th0), секретирующие все виды цитокинов. Они могут быть как общими предкурсорами Th1- и Th2-клеток, так и третьей популяцией Т-хелперов, как у людей пожилого и старческого возраста, у которых основную массу Т-лимфоцитов составляют Th0-хелперы, продуцирующие и IFN- γ , и IL-4 [53;82].

Макрофаги, являясь одними из множества прогностических биомаркеров, представляют собой дифференцированные клетки системы мононуклеарных фагоцитов, которая состоит из тканевых макрофагов, дендритных клеток, моноцитов циркулирующей крови и миелоидных клеток-предшественников в костном мозге. Как макрофаги, так и их предшественники, моноциты крови, известны своей фенотипической и функциональной неоднородностью и могут изменять свою физиологию в ответ на сигналы опухолевого микроокружения [252]. Было предложено классифицировать макрофаги на основе их функций и спектра секретируемых цитокинов и хемокинов на две различные подгруппы: классически активированные макрофаги, являющиеся ключевым звеном противомикробной защиты и острого воспалительного ответа, и альтернативно активированные макрофаги, участвующие в процессе ремоделирования тканей, разрешения воспалительного инфильтрата и, в случае онкозаболеваний, входящих в состав опухолевого микроокружения (опухоль-ассоциированные, TAM-макрофаги) [24;183;223;241].

Исходя из конкретной физиологической или патологической ситуации, была предложена еще одна классификация макрофагов: провоспалительные макрофаги M1 или противовоспалительные макрофаги M2 (рисунок 2). В отсутствие сигналов, ориентирующих макрофаги M1, макрофаги M2 способствовали пролиферации опухолевых клеток *in vitro* и на экспериментальных мышинных моделях [148;186;265]. В ряде исследований было предложено рассматривать TAM-макрофаги как совокупность M1 и M2 макрофагов, превалируя в сторону последних: фенотип и функции TAM (усиление ангиогенеза, ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса

и супрессия адаптивного иммунитета) во многом идентичны M2-макрофагам [7;181] Однако, данная классификация является ограничивающей для описания реального положения в опухолевом микроокружении: в большинстве исследований макрофаги имели смешанный фенотип, экспрессирующий маркеры как M1-, так и M2-типа [193;214].

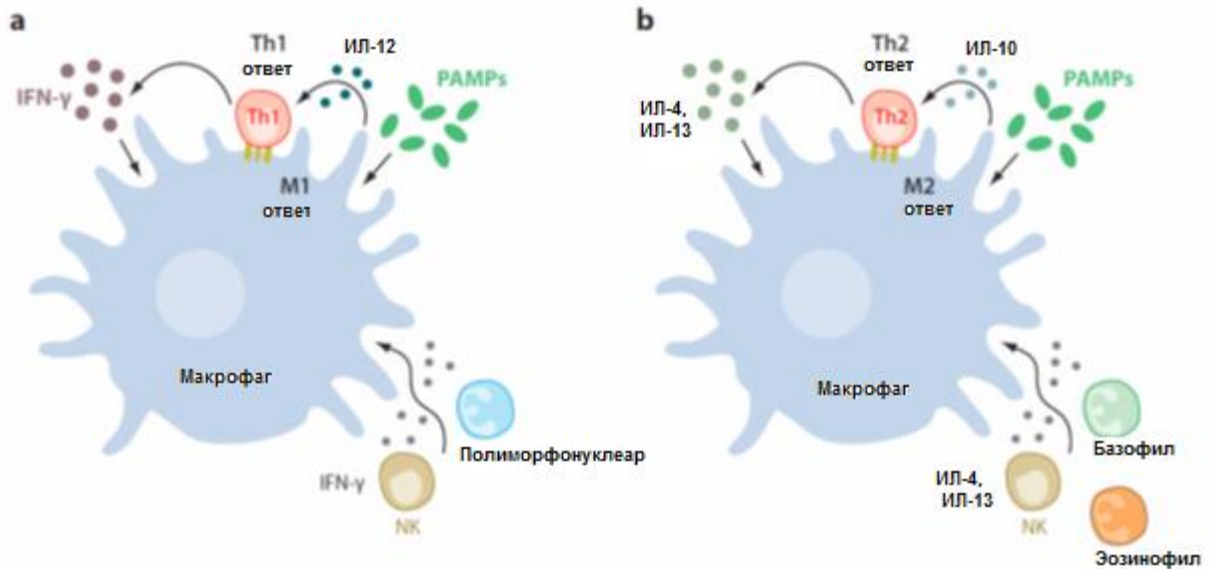


Рисунок 2. Функционирование M1- и M2-макрофагов [185].

Классически активированные макрофаги являются противоопухолевыми, а их производные цитокины способны уничтожать патогенные микроорганизмы. Они экспрессируют высокие уровни Th1-цитокинов, таких как TNF- α , iNOS, IL-1 β , 12, 18 и IL-23 [148], а после воздействия IFN- γ приобретают резкий провоспалительный ответ и онкоцидную активность [183;185;210].

Альтернативно активированные, TAM макрофаги являются проангиогенными (рисунок 3), способствующими росту и развитию опухоли [189]. Были описаны случаи содержания TAM-макрофагов в инфильтрате опухолевого узла до 50% от массы всех клеток [197]. TAM макрофаги развиваются из моноцитов крови, рекрутируемых из сосудистой системы опухоли с помощью опухолевых сигналов, таких как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор M-CSF (CSF-1), фактор хемотаксиса моноцитов CCL2 (MCP-1), фактор роста эндотелия сосудов VEGF и ангиопоэтин-2. Они регулируют различные ключевые этапы развития опухоли, индуцируя опухолевый лимфоангиогенез с помощью ангиогенного фактора тимидинфосфорилазы и метастазирование лимфатических узлов [231;268]. Большинство альтернативно активированных макрофагов имеют тенденцию накапливаться в слабо васкуляризованных гипоксических участках, где они вырабатывают проангиогенные цитокины и факторы роста эндотелиоцитов (VEGF, TNF- α , IL-8, фактор роста фибробластов FGF-b, CSF-1/M-CSF) [24; 215]. Также они обладают способностью накапливать факторы HIF-1 α , -2 α , усиливая свою адапта-

цию к гипоксии [7]. Секретируемые Th2-хелперами цитокины IL-4, IL-10 и IL-13 играют ключевую роль в альтернативной активации макрофагов и их протуморальной функции, однако сами TAM макрофаги также секретируют ряд Th2-цитокинов, таких как IL-10, TGF- β [99;135;193].

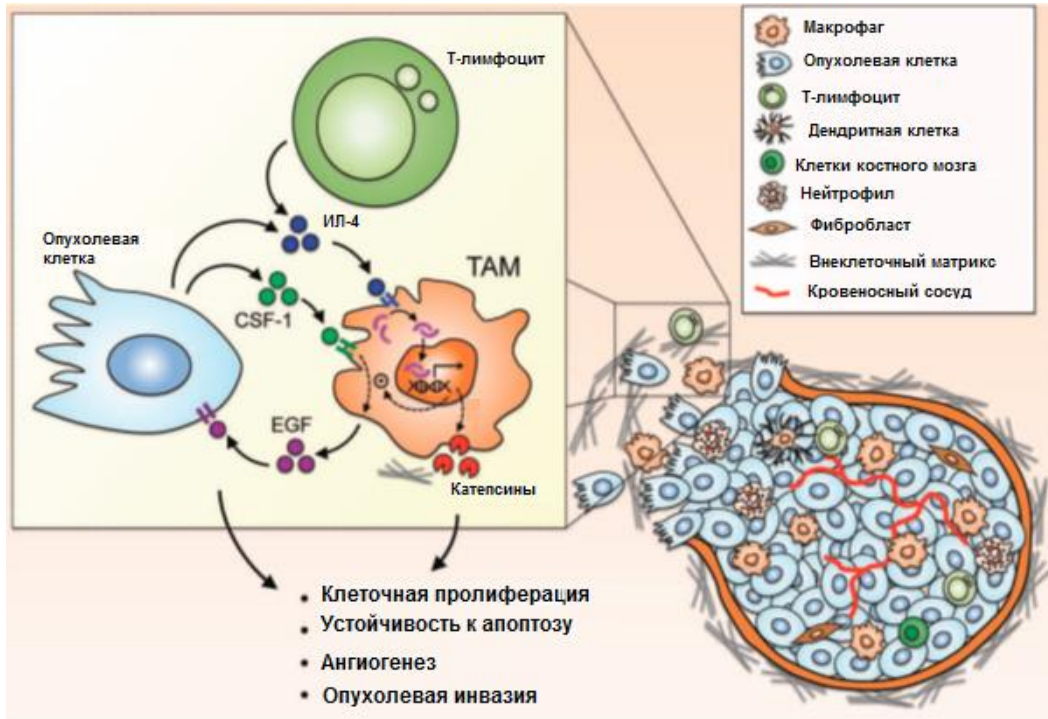


Рисунок 3. Взаимодействие иммунцитов с опухолевыми клетками [252].

TANs, опухоль-ассоциированные нейтрофилы, играют неоднозначную роль в микроокружении опухоли. По данным исследований [119] TAN-нейтрофилы секретируют провоспалительные молекулы, такие как CCL2, CCL3, CXCL8 и IL-6, стимулируют пролиферацию T-клеток и высвобождение IFN- γ , что смещает клеточный иммунный ответ в сторону Th1-пути. Нейтрофилы усиливают экспрессию костимулирующих молекул (например, CD86 и OX40L), усиливая петлю положительной обратной связи, что указывает на противоопухолевую роль TANs. Тем не менее, по результатам других исследований, было обнаружено, что TAN-нейтрофилы способствуют переносу опухолевых клеток, то есть стимулируют метастазирование, а нейтрофильные внеклеточные ловушки (NETs) захватывают циркулирующие опухолевые клетки и способствуют их приживлению [106;119;123].

Микроокружение опухоли часто направляет поляризацию макрофагов от фенотипа классически активированных макрофагов к фенотипу TAM. Опухолевые клетки формируют свое взаимодействие с макрофагами, избегая фагоцитоза и стимулируя TAM-подобную поляризацию через хемокины и цитокины (такие как CCL2, CSF1, TNF, IL-10 и трансформирующий ростовой фактор TGF- β). В соответствии с исследованиями последних лет [24;148;218], M2-тип

макрофагов часто вызывает рецидивы после химиотерапии, и в большинстве опухолей человека высокий уровень ТАМ связан с неблагоприятным прогнозом, а преобладание классически активированных макрофагов в опухолевых тканях, наоборот, дает больший шанс на выздоровление.

В последнее время успешно развиваются исследования новейшего поколения иммунных противоопухолевых препаратов – ингибиторов иммунных контрольных точек [225]. В 2018 году за открытие терапии онкологических заболеваний путем ингибирования отрицательной иммунной регуляции, а именно открытия механизма регуляции активации Т-клеток за счет взаимодействия между белковыми рецепторами PD-1 и CTLA-4 на поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов и их лигандами была присуждена Нобелевская премия японскому ученому Тасуку Хондзе и американскому ученому Джеймсу Эллисону. Иммунные контрольные точки – это ингибирующие механизмы, регулирующие иммунный ответ организма и препятствующие запуску аутоиммунных реакций в нормальных клетках. Злокачественные клетки приобретают данные механизмы для перепрограммирования их клеточного микроокружения, подавляя иммунный ответ организма: на своей поверхности они имеют повышенную экспрессию лигандов к иммунным контрольным точкам, тем самым запуская механизмы, ингибирующие ответ Т-лимфоцитов на опухолевые антигены [8;27;45;92;129;131]. Таким образом, чем выше экспрессия лигандов к белковым рецепторам PD-1 и CTLA-4, тем хуже прогноз. Ингибиторы иммунных контрольных точек – моноклональные антитела (ингибиторы PD-1 пембролизумаб (Кейтруда®), ниволумаб (Опдиво®), атезолизумаб (Тецентрик®); ингибитор CTLA-4 ипилимумаб (Ервой®)) - разрывают связь между целевыми рецепторами на Т-лимфоцитах и их лигандами на опухолевых клетках, тем самым активируя уничтожение последних (рисунок 4). Благодаря интенсивному развитию иммунотерапии появились определенные успехи в лечении одних из самых агрессивных форм онкологии с выраженным метастазированием – мелкоклеточного рака легкого и метастатической меланомы. Однако таргетные препараты обладают побочными эффектами, которые связаны с их иммуномодулирующим действием, наиболее тяжёлые из них - выраженные аллергические и аутоиммунные реакции. На сегодняшний день это действительно новый виток в развитии онкологии, очень успешный в отношении отдельных заболеваний, но в большинстве случаев служащий как дополнение к стандартным схемам лечения (пройдена регистрация в качестве второй рекомендуемой линии терапии, показана эффективность в 30-40% случаев заболеваний).

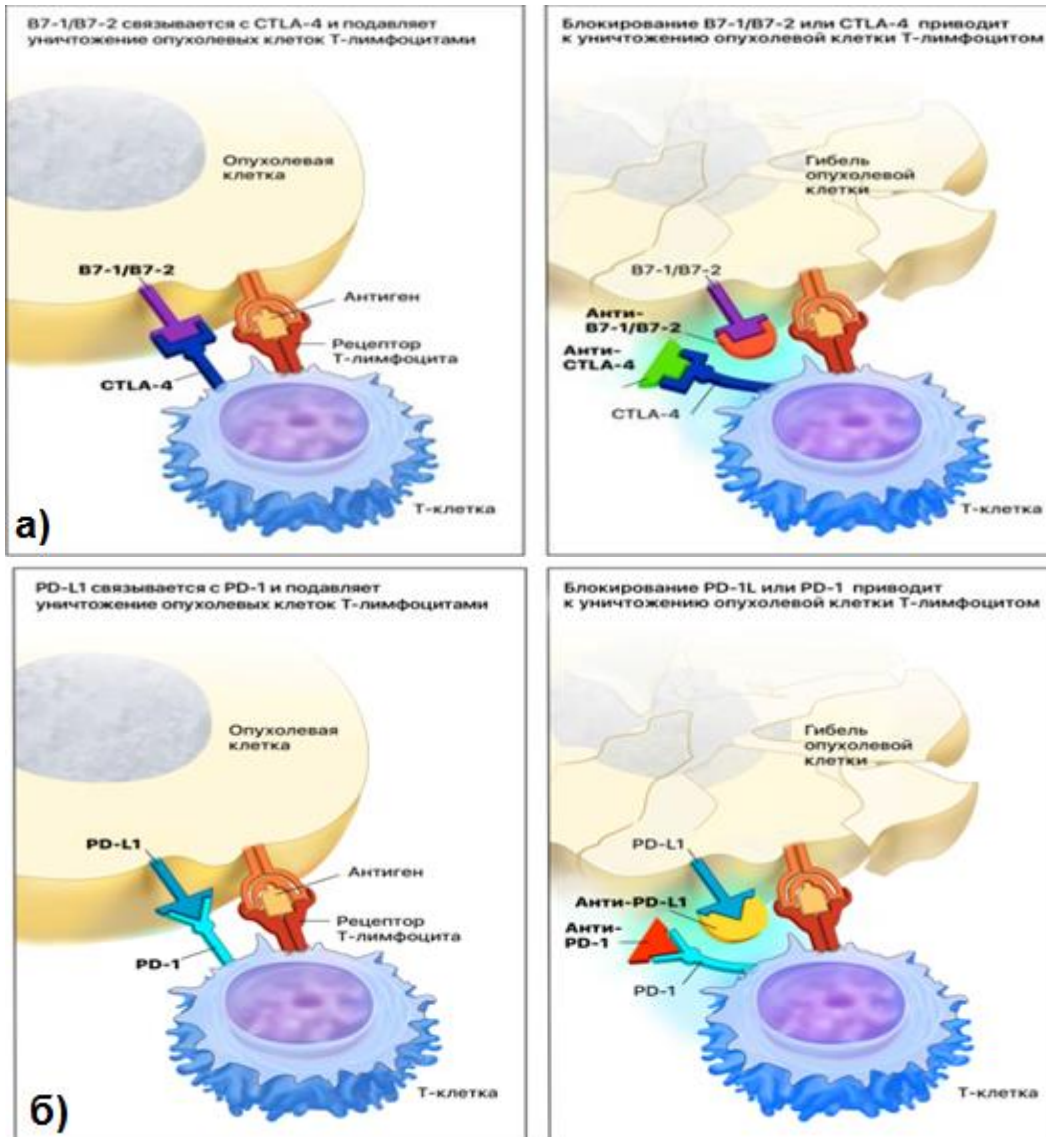


Рисунок 4. Механизм работы ингибиторов ИКТ: а) CTLA-4; б) PD-1.

1.2. Рак шейки матки

Онкогинекологические заболевания составляют значительную часть в общей структуре заболеваемости и смертности у женщин разных возрастных групп [1]. Рак шейки матки составляет 12-20% от общего числа злокачественных опухолей у женщин, занимая второе место (после рака молочных желез) среди злокачественных новообразований органов женской половой сферы и первое среди женской смертности по причине онкологии [12;51;61;67;73;80;271]. К сожалению, у значительной части пациенток РШМ обнаруживают уже на поздних стадиях заболевания (III–IV), когда эффективность всех возможных современных методов лечения резко снижается [61]. Злокачественным новообразованиям шейки матки предшествуют предопухольные изменения эпителия – цервикальная интраэпителиальная неоплазия (дисплазия, CIN). Дисплазия шейки матки представляется нарушением дифференцировки, созревания, старения и

апоптоза эпителиальных клеток, выстилающих шейку матки [50]. В зависимости от степени выраженности диспластических изменений различают легкую (CIN I), умеренную (CIN II) и тяжелую (CIN III) дисплазию [47]:

1) CIN 1 – легкая степень, наблюдаются полиморфизм клеток, незначительные нарушения дифференцировки эпителия с умеренной пролиферацией клеток базального слоя. Изменения захватывают не более 1/3 толщи (нижней трети) эпителиального пласта, начиная от базальной мембраны. Процесс обратим.

2) CIN 2 – умеренная степень, наблюдаются клеточный атипизм и многочисленные митозы, поражение занимает 1/2 толщи эпителиального пласта, начиная от базальной мембраны. Процесс обратим.

3) CIN 3 – тяжелая степень, наблюдается поражение более 2/3 эпителиального пласта. Наблюдаются нарушения взаимоотношений клеточного [80] расположения, гигантские гиперхромные ядра. Процесс необратим. При поражении всего эпителиального пласта вплоть до базальной мембраны – рак *in situ*. Согласно классификации ВОЗ (1982 г.) понятия тяжелая дисплазия и рак *in situ* объединены в один патологический процесс [47;50;59;65].

Достоверно подтверждено, что иницирующими факторами риска и развития патологических процессов на шейке матки являются ранее начало половой жизни, большее число половых партнеров, пренебрежение барьерными методами контрацепции, сексуально-трансмиссивные заболевания в истории болезни (хламидиоз, генитальный герпес), инфекции, вызванные условно-патогенной микрофлорой (цитомегаловирусная и Эпштейна-Барра инфекции, вирус папилломы человека), влагалищный дисбиоз [12;51;61], а также разрывы шейки матки вследствие частых родов и другие травмы, нарушение гормонального гомеостаза, нейроэндокринно-обменные нарушения [47;59]. Однако многочисленные исследования подтверждают главный иницирующий фактор развития рака шейки матки - Вирус Папилломы Человека (ВПЧ) [11;12;15;18;33;47;50;51;61;63;64;73;80;81;86;137] - 99,7% случаев РШМ вызвано различными типами ВПЧ. Было показано, что различные типы ВПЧ обладают тропизмом к слизистым оболочкам и эпидермальному плоскому эпителию, вызывая такие заболевания, как ВПЧ-ассоциированный рак шейки матки и рак носоглотки [11]. ВПЧ имеет диаметр 55 нм и является двухцепочечной кольцевидной молекулой ДНК массой 3-5 мДа, состоящей из 8000 нуклеотидных оснований [57]. ВПЧ 16-го типа и его родственные – 18,31, 33, 39, 50, 59 - обнаружены в 67-69% случаев развития РШМ, а ВПЧ 30, 35, 45, 53, 56 – в 27% случаев развития опухоли [11;12;18;61;64;73;81;137]. Суть жизненного цикла и, соответственно, инфекционного процесса ВПЧ заключается в образовании вирионов и последующей репликации внутри клетки, трансформируя ее ДНК (рисунок 5). Попав в эпителиальную клетку через базальную мембрану, вирус высвобождает собственное ДНК из оболочечной структуры - капсида, вирусные молекулы

нуклеиновых кислот транспортируются в клеточное ядро: клеточная ДНК претерпевает мутацию, происходит нарушение стабильности клеточного генома, запускается синтез онкоспецифичных белков E6 и E7, накапливаются мутантные клетки, содержащие интегрированную ДНК ВПЧ, и развивается вторичное воспаление – запускается процесс злокачественного опухолевого роста. Капсидные онкобелки E6 и E7 обладают повышенной способностью к мутагенной активности и играют ключевую роль в регуляции апоптоза, пролиферации, инвазии и неоангиогенеза, инактивируя гены-супрессоры опухолевого роста p RB и p 53, а также оказывают выраженное иммуносупрессивное действие, благодаря которому ВПЧ-инфицированные клетки минуют иммунологический контроль и не разрушаются посредством апоптоза [11;12;15;59;61;62;78;79;84]. Важно отметить, что ВПЧ поражает только клетки эпителия, не вызывая при этом системного иммунного ответа, таким образом выработка специфических антител не происходит, что способствует длительной персистенции вируса в организме при отсутствии стойкого иммунитета. Период трансформации здоровых клеток в злокачественные может занимать от 5 до 10 лет [15].

HeLa – линия опухолевых клеток человеческого рака шейки матки, используемая во множестве научных исследований. Клеточная популяция была получена от образцов опухолевой ткани, извлечённой у Генриетты Лакс в 1951 году. Клетки HeLa, с самого начала зараженные ВПЧ-18, интенсивно производят теломеразу, наращивающую теломеры на концах ДНК хромосом, за счет чего клетки пролиферируют необычайно быстро даже в сравнении с другими раковыми клетками, и являются самой быстро-делящейся бессмертной линией человеческих клеток. На поверхности клеток HeLa наблюдается широкоуниверсальный рецепторный набор, благодаря которому возможны исследования воздействий различных веществ на опухолевые клетки, от простых неорганических соединений до белков и нуклеиновых кислот. Клеточная линия HeLa стала первой бессмертной и стабильной популяцией клеток, позволяющей производить исследования, адекватно имитируя свойства организма.

Преобладание уровня цитокинов определенной оппозиционной группы играет важную роль в развитии ВПЧ-индуцированной дисплазии шейки матки: установлено, что смещение цитокинового профиля в сторону преимущественной продукции цитокинов Th1-типа – IFN- γ и IL-2, имеет фундаментальное, наиважнейшее значение для формирования эффективной иммунной защиты против развития ВПЧ и прогрессирования предраковых состояний рака шейки матки, поскольку клеточный иммунитет является ключевым в контроле роста ВПЧ-трансформированных клеток. У мышей с нарушениями γ -интерфероногенеза наблюдался рост спонтанных и химически индуцированных опухолей, что доказывает защитную функцию IFN- γ [188]. Повышенная продукция IL-4 и других провоспалительных цитокинов, особенно выраженная на стадиях CIN III и раке *in situ*, свидетельствует об угнетении клеточного иммунного

ответа Th1-типа и сдвиге цитокинового профиля в сторону продукции цитокинов Th2-типа, стимулирующих гуморальный иммунный ответ [44;51;72]. В настоящее время, по данным клинических исследований повышенный уровень IL-4 является прогностическим маркером при дисплазии шейки матки, предраковом состоянии [44;72]. Нарушение α - и γ -интерфероногенеза свидетельствуют о переходе вирусной инфекции в хроническое воспаление, длительной персистенции вируса в трансформированных клетках и процессе их перехода в малигнизированную форму [44]. Принимая во внимание тот факт, что полное излечение от папилломавирусной инфекции на сегодняшний день все еще остается невозможным, цели противовирусной терапии сводятся к переводу ВПЧ-ассоциированной инфекции в стадию устойчивой ремиссии, т. е. клинического выздоровления [64]. Некоторые цитокины подавляют транскрипцию вируса папилломы, например, TGF- β и IL-1, а также TNF- α . Большой интерес представляет цитокиновая аутогемохимиотерапия в комбинации с аутогемоиммунотерапией, применяемая в настоящий момент при раке шейки матки – IL-2 (Ронколейкин, Пролейкин), инкубированный на аутокрови, и IFN- α -2b (Реаферон) достоверно повышали эффективность химиотерапии и выживаемость [19;42;43].

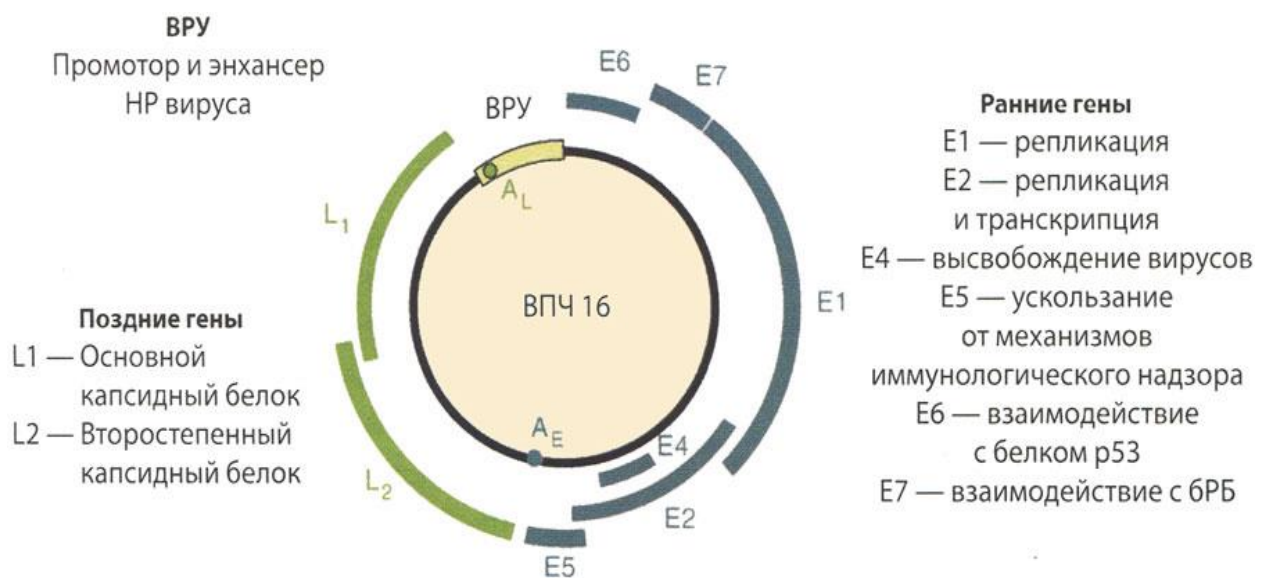


Рисунок 5. Жизненный цикл ВПЧ на примере ВПЧ 16.

Работа над вакциной против ВПЧ началась в середине 1980-х годов в Австралии и США. В 2006 году FDA разрешило первую профилактическую вакцину против ВПЧ под торговым названием Гардасил (Merck & Co). В июне 2007 года другая вакцина Церварикс (GlaxoSmithKline) была сертифицирована в Австралии, в сентябре — в Европейском Союзе. Профилактические вакцины были разработаны для предупреждения заражения вирусами па-

пилломы человека, связанными с развитием рака шейки матки, но они не эффективны для лечения уже протекающей инфекции ВПЧ. Тем не менее, данные вакцины не охватывают все типы ВПЧ – новейшая форма Гардасила содержит белки 9 самых высокоонкогенных типов ВПЧ. Вакцины рекомендованы для применения девушкам от 9 до 26 лет, однако есть данные об их эффективности при вакцинации женщин вплоть до 45 лет. Рекомендуемый курс вакцинации Гардасилом состоит из трех доз: вторая назначается через 2 месяца после первой, третья доза – через 6 месяцев после первой. Обращает внимание, что длительность персистенции защитных антител при вакцинировании Цервариксом составляет 7 лет, Гардасилом – 5 лет [56;63]. Согласно результатам клинических исследований, побочных эффектов после вакцинирования не наблюдалось, однако констатировались единичные случаи развития аутоиммунных заболеваний, в том числе рассеянного склероза (в 2018 году в Сан-Диего на 3-ем ежегодном американском съезде по лечению и исследованиям рассеянного склероза (ACTRIMS) был опубликован доклад “Развитие рассеянного склероза у двух подростков после вакцинации против ВПЧ”), а также тяжелых поражений эпителия шейки матки, что свидетельствует о неполном исследовании безопасности применения вакцины.

В настоящее время для лечения больных РШМ используют различные методы лечения: лучевой, хирургический и химиотерапевтический. Хирургическое вмешательство выполняется, как правило, пациентам с начальными стадиями заболевания. Благодаря успешному развитию химиотерапии, онкобольным с РШМ в схему лечения стали включать платиносодержащие препараты. Применение полихимиотерапии позволило у ряда больных добиться выраженной регрессии опухоли, переводя форму заболевания в условно локализованную для возможности выполнения хирургического вмешательства [67]. В настоящее время главной концепцией клинической онкологии является органосохраняющее лечение опухолей: при инвазивном РШМ внедрена методика транспозиции яичников, позволяющая сохранить их функциональность при проведении лучевой терапии, многократно повышая качество жизни пациенток репродуктивного возраста [73].

1.3. Рак легкого

Рак легкого занимает лидирующую позицию в структуре онкологической заболеваемости в мире. Согласно статистике ВОЗ (2018 г.) 1,76 млн случаев заболевания раком легкого стали причиной смерти [52;236]. В зависимости от течения, стадии и клинико-анатомической разновидности онкологического заболевания применяют различные варианты системной моно- или полихимиотерапии, хирургического лечения с последующей химиотерапией и лучевой терапией, разрабатываются новые перспективные схемы и комбинации с тенденцией к большей эффективности и меньшей токсичности для онкобольных [48;52].

Канцерогенное действие на легочную ткань оказывает множество химических веществ и курение – увеличение случаев заболеваемости РЛ находится в прямой корреляции с увеличением потребления сигарет [54;77;204]. Рак легкого можно разделить на две основные гистопатологические формы – немелкоклеточный (НМРЛ) и мелкоклеточный (МРЛ) [6;266]. Немелкоклеточный, в свою очередь, включает в себя плоскоклеточный, железистый (аденокарцинома) и крупноклеточный рак [5]. Мелкоклеточный рак легкого составляет 15-20% случаев заболевания рака легкого и сопровождается наиболее агрессивным общеклиническим течением: быстрый рост первичной опухоли, раннее распространение метастазов. В свою очередь, немелкоклеточный рак легкого составляет 80-85% случаев заболевания и является причиной большего числа смертных случаев. Согласно классификации по локализации новообразования различают рак легкого, возникающий в крупных бронхах – центральный рак, и в более мелких бронхах или в паренхиме легкого – периферический [77]. Выраженность клинической симптоматики при различных видах рака легкого зависит от множества факторов, таких как: размер новообразования, его локализация, клиничко-анатомическая форма опухоли, гистологическая структура, характерная локализация метастазов, а также сопутствующие воспалительные изменения в тканях [2]. После бронхоскопии или трансторакальной пункции и дальнейшего морфологического подтверждения диагноза проводится компьютерная томография (КТ) грудной клетки и брюшной полости, а также магнитно-резонансная томография (МРТ) головного мозга с контрастированием и сцинтиграфия костей (остеосцинтиграфия) для выявления стадии опухолевого заболевания [9;77]

Практически всегда при раке легкого наблюдается инактивация супрессорных биохимических каскадов. Как и опухолевые узлы другого гистологического происхождения [135;189;223], НМРЛ создает иммуносупрессивное опухолевое микроокружение [101;181;204;258], способствующее росту опухоли: примерно 2/3 клеток составляют инфильтрирующие опухоль лимфоциты различного морфологического типа (в том числе 32% CD3+/CD4+, 65% CD3+/CD8+ Т-клеток и другие, имеют общее название – TILs), также являющиеся одним из прогностических маркеров, другая треть клеток являются TAM-макрофагами. Большая часть этих клеток находится в строме опухоли, за исключением некоторых типов лимфоцитов, находящихся в опухолевых островках [157]. Было показано, что в структуре немелкоклеточного рака легкого содержится большое количество регуляторных Treg клеток, которые ингибируют пролиферацию Т-клеток, реактивных против опухолевых антигенов. Как и в случае других видов онкологических заболеваний, повышенные уровни Tregs в НМРЛ коррелируют с инвазивностью опухоли и метастатическим потенциалом. Учитывая очевидную роль иммунной системы в НМРЛ, перспективная иммунотерапия РЛ может быть подразделена на

антиген-специфическую, активную терапию противораковыми вакцинами, и антиген-неспецифическую, пассивную терапию ингибиторами иммунных контрольных точек [101;160].

В течение продолжительного времени подбор схем и режимов лечения больных НМРЛ носил сугубо эмпирический характер, однако ведение онкопациентов в будущем должно быть сконцентрировано на научно обоснованном выборе терапии, с учетом индивидуальных и прогностических факторов. Золотым стандартом при оценке успеха лечения любого вида рака является общая выживаемость. К сожалению, немелкоклеточный рак легкого имеет один из самых низких и слабо прогнозируемых результатов: в зависимости от молекулярного полиморфизма опухолевых клеток [126;196] у больных НМРЛ с идентичными диагнозом и стадией заболевания выживаемость может составлять несколько недель и варьировать вплоть до 5 лет. Противоопухолевое лечение больных немелкоклеточным раком легкого назначается в виде таргетной [66] и/или химиотерапии, а также лучевой [266] терапии. Были идентифицированы молекулярные маркеры, которые обеспечивают основу для таргетной терапии рака легкого: EGFR, K-Ras, p 53 и EML4-ALK [62;159]. В настоящее время на первой линии химиотерапии используются платиносодержащие комбинации (при противопоказаниях к применению цисплатина используют альтернативный препарат - карбоплатин [2;10;77]) с включением химиопрепаратов 3-го поколения (паклитаксела, гемцитабина, винорельбина, доцетаксела, пеметрекседа) или этопозиды. Наиболее изученными и часто применяемыми химиотерапевтическими сочетаниями являются комбинации винорельбина и цисплатина, гемцитабина и цисплатина, паклитаксела и цисплатина, паклитаксела и карбоплатина, гемцитабина и карбоплатина, а также этопозиды и цисплатина [66]. Комбинации, не включающие платину, могут быть использованы в том случае, если производные платины противопоказаны или неэффективны. Пожилым пациентам рекомендовано использование монотерапии препаратами винорельбин, пеметрексед или гемцитабин [2]. Химиотерапия II линии назначается при прогрессировании опухолевого процесса, уменьшая симптоматику и увеличивая продолжительность жизни онкопациентов. Тем не менее, благоприятный исход на I и II стадии НМРЛ возможен с удовлетворительными отдаленными результатами [77].

Несмотря на высокую кардиотоксичность, доксорубицин, интеркалятор ДНК и индуктор иммуногенной гибели клеток, до сих пор применяется в системной полихимиотерапии на IV стадии немелкоклеточного рака легкого, а также при лечении мелкоклеточного рака с наиболее агрессивным течением [5;130]. Стандарт лечения антибиотиками антрациклинового ряда улучшает выживаемость, однако способствует развитию тяжелых кардиологических осложнений, снижая качество жизни пациентов. В последнее время активно разрабатываются липосомные формы для снижения кардиотоксичности химиопрепаратов [22], тем не менее на данный мо-

мент проблема осталась нерешенной и специфическое лечение кардиомиопатий, развивающихся на фоне применения химиотерапии, также не разработано [89].

В экспериментальных исследованиях используют эпидермоидную карциному легкого Льюис (LLC) - спонтанную опухоль, которая метастазирует гематогенно в легкие в 100% случаев, выделенную от мышей C57BL/6 и поддерживаемую подкожной или внутримышечной трансплантацией с 1951 года. С тех пор были созданы многочисленные клеточные линии *in vivo* и *in vitro*, и в настоящее время все они широко используются в экспериментальных исследованиях. Сродство между опухолевыми клетками рака легкого человека и клетками опухоли Льюиса заставляет предположить, что последние являются мышшиной опухолью, эквивалентной бронхиоло-альвеолярной аденокарциноме [125]. Клеточная линия обладает высокой опухолевой способностью и в основном используется для моделирования метастазирования, а также для оценки эффективности химиотерапевтических агентов *in vivo* [222]. Линия клеток LLC обычно вводится подкожно мышам линии C57Bl6 в объеме $3-6 \times 10^6$ клеток на мышшь и в течение двух недель после инкубации опухоли достигают $2,2 \pm 0,4$ мм [26].

1.4. Интерлейкин-4

IL-4 – мультифункциональный пептид массой 15-20 кДа, секретирующийся в макрофагах, дендритных, тучных и NK-клетках, базофильных и эозинофильных лейкоцитах, Th2-лимфоцитах. IL-4 был первоначально описан как фактор роста В-клеток и регулятор пролиферации и переключения иммуноглобулинов в В-клетках [198;262]. Цитокин играет основную роль в адаптивном и гуморальном иммунитете, влияя на дифференциацию плазматических клеток из В-клеток и на пролиферацию активированных Т- и В-клеток, стимулирует рост и дифференцировку гематопоэтических клеток [198]. Современные исследования определили [252], что IL-4 способствует превращению макрофагов в опухоль-ассоциированные макрофаги (альтернативно-активированные макрофаги TAM). Эти клетки выражено влияют на процесс метастазирования и являются ключевыми медиаторами в опухолевом ангиогенезе [163;252;265]. В первичной опухоли макрофаги микроокружения под влиянием IL-4, продуцируемого CD4+ Т-клетками и опухолевыми клетками [252;262], способствуют инвазии метастатических опухолевых клеток (рисунок б). Эта инвазия опосредуется через паракринную петлю благодаря опухоль-синтезированному CSF1(колониестимулирующему фактору) и макрофаг-продуцируемому EGF (эпидермальному фактору роста), которая приводит к миграции опухолевых клеток к макрофагам вдоль коллагеновых волокон, действующих как пути к кровеносным сосудам. Эти потоки опухолевых клеток приводят к их накоплению на сосудах, где макрофаги способствуют их интравасии в кровеносные или лимфатические сосуды через структуру, названную сетью опухолевого микроокружения (TMEN) [184;203].

Высокий уровень IL-4 был найден в микроокружении опухоли и периферической крови пациентов с раком простаты, немелкоклеточным раком легких, злокачественными новообразованиями мочевого пузыря, груди, почек [232]. Данный факт, вероятно, объясняется повышенной экспрессией IL-4R на опухолевых клетках по сравнению с таковыми на нормальных клетках (таблица 1) [158;212]. Экспрессия рецептора IL-4R обнаруживается на большинстве Т-, В-лимфоцитов, тучных клеток, макрофагов, фибробластов и большинстве эпителиальных клеток, но количество рецепторов на нормальных клетках, как правило, является крайне низким [198]. Согласно данным клинических исследований, IL-4 выражено повышал пролиферацию раковых клеток толстой кишки, груди, головы и шеи, яичников, простаты [96;172;262].

Таблица 1.

Экспрессия IL-4R в нормальных человеческих клетках и линиях опухолевых клеток

Нормальные клетки	Количество сайтов связывания IL-4 на 1 клетку
Базофилы	300-600
Эндотелиальные клетки	<50
Покоящиеся Т- и В-клетки	<500
Моноциты	200-300

Опухолевые клеточные линии	Количество сайтов связывания IL-4 на 1 клетку
Карцинома почек	1400-4000
Злокачественная меланома	1200-1400
Рак яичников	300-1400
Саркома Капоши	600-2200
Эпидермоидная карцинома	1000
Рак груди	700-4600
Глиобластома	1000-3000
Рак толстой кишки	2000
Рак головы и шеи	6100-13000

В соответствии с типом секретируемых цитокинов Т-клетки классифицируются на Th1, которые продуцируют IFN- γ , IL-2 и фактор некроза опухолей бета (TNF- β), и Th2, продуцирующие IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 и IL-13. Эти два типа Т-клеток являются кросс-ингибиторами: IFN- γ и IL-2 способствуют генерации Th1-клеток и ингибируют развитие Th2-клеток, в противоположность этому IL-4 управляет развитием Th2-клеток и ингибирует Th1-ответ, понижая проти-

воопухолевую активность CD8⁺ Т-клеток. Таким образом, IL-4 способствует поддержанию Th2-поляризованных иммунных реакций и подавляет противоопухолевый иммунитет [139; 175;216;229;230;270].

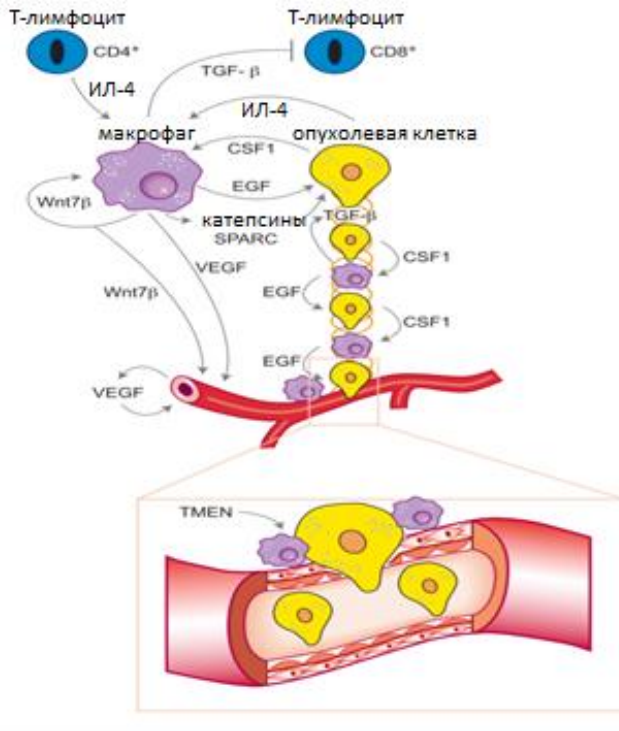


Рисунок 6. Механизм интравасии опухолевых клеток в кровеносное русло [203].

Существует два типа рецепторов к IL-4 (рисунок 7): рецептор типа 1 состоит из α -цепи (IL-4R α) и γ -цепи (IL-4R γ); рецептор типа 2 состоит из IL-4R α и IL-13R α 1. IL-4 связывается с IL-4R α с высоким сродством, что приводит к реконструированию γ -цепи или IL-13R α 1 с образованием тройных лиганд-рецепторных комплексов. Димеризация рецепторных субъединиц активирует связанные с рецептором Janus-киназы и приводит к фосфорилированию остатков тирозина в цитоплазматическом домене IL-4R α , которые затем служат в качестве стыковочных сайтов для приема других сигнальных молекул, включая “трансдуктор сигналов и активатор транскрипции” – STAT 6 – первичный белок STAT, активированный в ответ на стимуляцию IL-4. Тирозиновый остаток STAT 6 далее фосфорилируется с помощью JAKs, отделяется от рецептора и димеризуется через взаимные взаимодействия между его SH2-доменом и остатком фосфотирозина на втором STAT 6. Димеризованные активированные комплексы STAT 6 транслоцируются в ядро, связываются с мотивом ДНК в промоторах генов-мишеней и инициируют их транскрипцию [93;227;252;268]. STAT 6 играет важную роль в клетках-мишенях посредством модификации клеточной дифференцировки и роста, а также индукции устойчивости к апоптозу [268]. Мыши, нокаутные по IL-4 и STAT 6 имеют повышенную устойчивость к развитию и ро-

сту опухоли [95;249], в некоторых исследованиях также наблюдалось отторжение имплантированных опухолей и дефектное развитие Th2-клеток [155;216;227;238;252]. IL-4 непосредственно воздействует на раковые клетки и клетки иммунного микроокружения [174] во время развития опухоли, увеличивая их устойчивость к апоптозу и ускоряя рост опухоли [244].

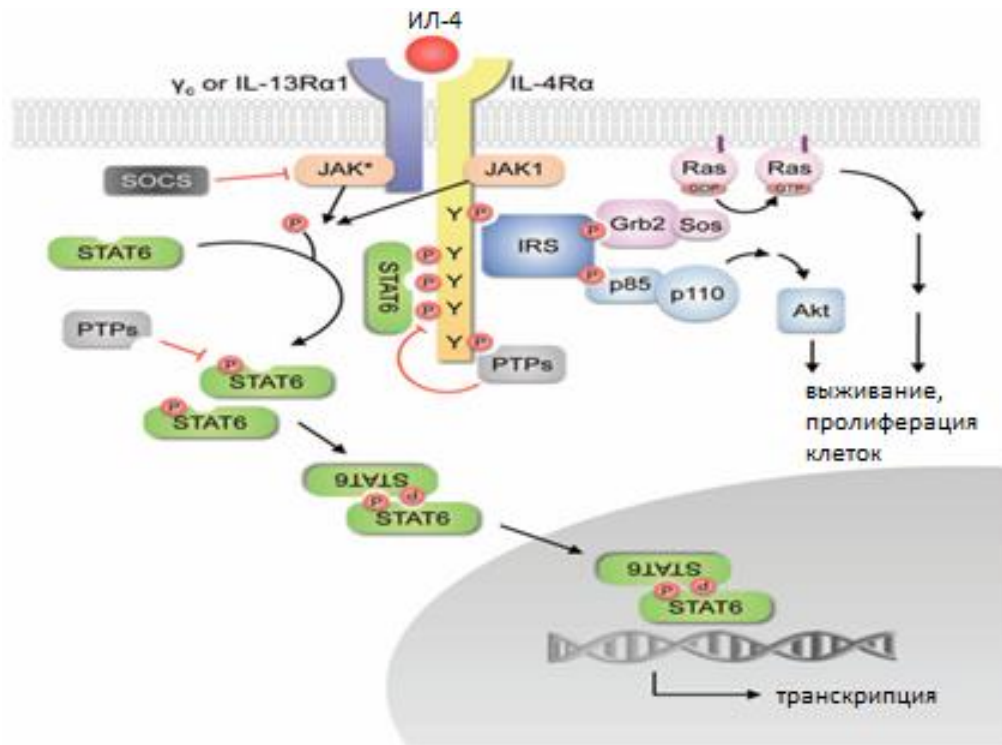


Рисунок 7. Механизм действия IL-4 на молекулярном уровне [252].

1.5. Интерлейкин-6

IL-6 – цитокин с молекулярной массой 19-34 кДа (184 аминокислоты), состоящий из четырех α -спиралей [262]. Это антиапоптотический провоспалительный цитокин, играющий центральную роль в опухолевом росте [74;128;242]. Экспрессию IL-6 контролирует транскрипционный фактор NF- κ B, что приводит к синтезу цитокина при любом виде воспаления. Согласно клиническим исследованиям наблюдалось повышение концентрации IL-6 в сыворотке крови при сепсисе, ожирении, диабете, инсулинорезистентности, воспалительных заболеваниях [149] желудочно-кишечного тракта, артрите, аутоиммунных заболеваниях [239;246], алкогольном циррозе и различных видах рака. IL-6 секретируется макрофагами, Т- и В-лимфоцитами, гепатоцитами, эндотелиальными и мезангиальными клетками, фибробластами [113], опухолевыми клетками различного генеза [97;141], и способен действовать аутокринно или дистанционно (паракринно, эндокринно) на другие клетки организма [14;79]. IL-6 участвует в развитии хронического воспаления [23;74], а также влияет на регуляцию и развитие иммунных механизмов защиты организма.

Было установлено, что IL-6 выражено влияет на регуляцию иммунного ответа: усиливает процесс пролиферации и дифференцировки Т- и В-клеток [113], секрецию иммуноглобулинов, потенцирует антителообразование, подавляет апоптоз нейтрофилов и макрофагов, обладающих цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток, стимулирует гепатоциты к синтезу различных белков [23]. Повышенная концентрация IL-6 у онкопациентов является причиной нарушения функционирования одного из звеньев иммунного ответа – дендритных клеток (ДК): при блокировании синтеза IL-6 созревание и дифференцировка ДК восстанавливалась [197]. Усиление синтеза IL-6 может быть вызвано как механическим повреждением тканей, так и немеханическими стрессовыми факторами: облучением УФ-волнами, радиацией, реактивными формами кислорода, микробными и вирусными продуктами [14;79].

Согласно данным литературы IL-6 провоцирует разрастание многих экспериментальных опухолей: рака легких, молочной и предстательной желез, поджелудочной железы, меланомы, рака шейки матки [250], мочевого пузыря, колоректального рака [83;242]. Повышение уровня IL-6 наблюдалось при многих патологических состояниях, в том числе при саркоме Капоши, миксеме сердца, лимфоме, миеломе и карциноме почек [146]. Результаты многих исследований свидетельствуют о том, что мыши, нокаутные по IL-6, устойчивы к развитию плазмоцитомы, а снижение уровня IL-6 коррелирует с лучшим ответом на противораковую терапию в клинической практике [128;146;262]. IL-6 защищает опухолевые клетки от апоптоза, вызванного стрессом и цитотоксическими лекарственными средствами [242], предотвращает клеточное старение путем увеличения активности теломеразы, продолжая способствовать росту опухоли [261]. В исследованиях Kottke T. и соавторов [166] было показано, что повышенные уровни в сыворотке IL-6 присутствовали в группе мышей с опухолевым заболеванием только на ранней стадии (первичный узел < 0,2 см), но не на более поздних стадиях (> 0,5 см). Эти данные свидетельствуют о том, что IL-6 можно использовать в качестве ценного маркера стадии, на которой спящая опухоль начинает расти и рецидивировать.

В классическом сигнальном пути IL-6 связывается на поверхности клетки с рецептором IL-6R, не являющимся сигнальным и в норме экспрессирующимся только на клетках паренхимы печени и энтероцитах кишечника [14]. Рецептор для IL-6 состоит из 2 полипептидных цепей: α -цепь – молекула gp 80 (собственно IL-6R), и β -цепь - молекула gp 130. Комплекс IL-6 и его рецептора IL-6R связывается с gp 130 и вызывает димеризацию его цепей с помощью дисульфидного мостика – активируются ассоциированные Janus-киназы JAK 1 и JAK 2 (рисунок 8) и, соответственно, пути JAK/STAT 3 (STAT-сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции), PI3K/Akt (из семейства фосфоинозитолкиназы 3) и Ras/MAPK – три основных сигнальных пути, участвующих в развитии опухоли [74;146;272]. Активация этих путей приводит к развитию инвазии и миграции опухолевых клеток, ангиогенеза, антиапоптотической активно-

сти и повышенной клеточной пролиферации. Согласно данным доклинических исследований, на модели множественной миеломы было обнаружено, что активация gp 130 под воздействием ИЛ-6 способствует росту малигнизированных клеток, препятствуя их апоптозу [74;79].

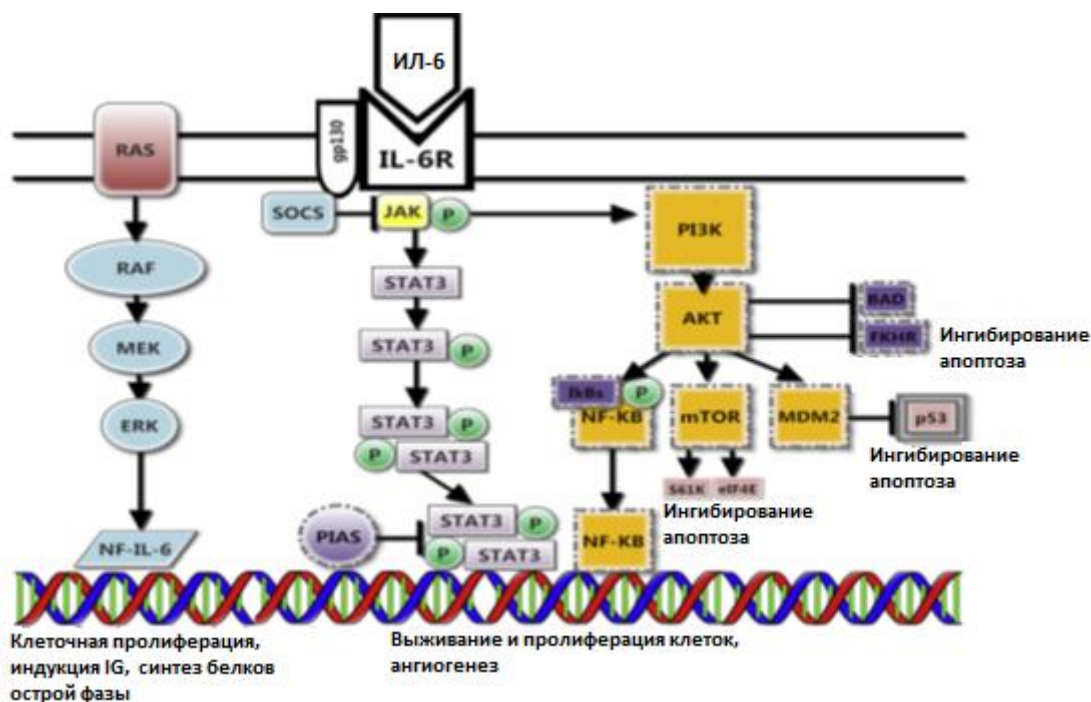


Рисунок 8. Механизм действия ИЛ-6 на молекулярном уровне [262].

Широко известно, что STAT 3 участвует в канцерогенезе, поскольку этот фактор транскрипции был обнаружен активированным во многих злокачественных формах рака в случаях онкопациентов и на культивированных опухолевых клетках человека, а также неоднократно ассоциировался с воспалением, пролиферацией и выживанием клеток, прометастатической активностью и ангиогенезом [262]. После активации Janus-киназ белки JAKs кросс-фосфорилируются и активируются. Фосфорилированные участки на рецепторе и белках JAK служат местами связывания с белками STAT, содержащими SH2-группы, такими как STAT 3, а также для SH2-содержащих белков, которые соединяют рецептор с MAP-киназами, PI3K/Akt и другими клеточными путями. Фосфорилированные STAT димеризуются и транслоцируются в ядро, связываются с мотивом ДНК (короткой последовательностью нуклеотидов, слабо меняющейся в процессе эволюции и имеющей определённую биологическую функцию) в промоторах генов-мишеней и инициируют их транскрипцию. Сигнальный путь с участием STAT 3 является основным онкогенным путем, постоянно активным в различных гистологических вариантах опухолей, а также ключевым в связи хронического воспаления и рака [98;270].

Сигнальный путь Ras/MAPK приводит к ангиогенезу за счет стимуляции синтеза VEGF, что продемонстрировали результаты ряда исследований [233]. Повышенный синтез фактора роста эндотелия сосудов VEGF приводит к росту, дифференциации и выживанию клеток посредством стимуляции клеточного цикла [242;262], а также к метастазированию. Сверхэкспрессия IL-6 в определенных органах – мозге, легких, печени, костном мозге, может привлекать циркулирующие опухолевые клетки в эти органы и способствовать их прогрессированию в пораженных тканях [261]. Гуманизированное анти-IL-6R моноклональное антитело тоцилизумаб было разработано более десяти лет назад и широко использовалось для лечения ревматоидного артрита и системного юношеского идиопатического артрита, болезни Каслмана и болезни Крона [49;262]. Однако в последние годы значительное внимание уделяется исследованию противоопухолевого потенциала тоцилизумаба. В исследовании Shinriki и соавторов [228] 20-дневный курс тоцилизумаба на мышинной модели человеческого рака полости рта показал резкое подавление роста опухоли. Авторы продемонстрировали, что противоопухолевое действие тоцилизумаба связано с ингибированием экспрессии VEGF и подавлением ангиогенеза, фосфорилирование STAT 3 заметно снижалось во время лечения. Было обнаружено, что противоопухолевая активность также продолжается после прекращения приема лекарственного средства онкопациентами.

Данные многочисленных исследований показали, что IL-6 путем активации сигнального пути JAK/STAT 3 индуцирует экспрессию матриксных металлопротеиназ MMP-2 и MMP-9, ремоделирующих внеклеточный матрикс, основная функция которых – разрушение базальной мембраны и облегчение клеточной инвазии [110;164;165]. Их экспрессия является одним из ключевых признаков прогрессирования рака.

Помимо классических сигнальных путей с участием IL-6, существует “транс-сигнальный” путь: растворимая форма рецептора IL-6, образуемая с помощью протеазы ADAM17 связывает свободный IL-6. Далее комплекс связывается с поверхностным белковым ко-рецептором gp 130, синтезируемым множеством типов клеток организма, и запускается каскад реакций, как в классическом сигнальном пути [14;17;242], способствуя выживанию малигнизированных клеток, дальнейшей пролиферации и инвазии.

1.6. Семейство интерлейкина-17

В 2005 году группа ученых Harrington L.E., Langrish C.L., Park H. и соавторы открыли новый подтип Т-хелперных клеток – Th17-лимфоциты, секретирующие IL-17A и IL-17F (два основных цитокина из данного семейства, все представляют из себя гомодимерные молекулы массой 20–30 кДа, содержащие 155-202 аминокислотных остатков, при этом консервативная C-концевая область у всех одинакова и состоит из 4 цистеиновых остатков, формирующих внутримолекулярные дисульфидные связи [36; 57]), вместе с тем обнаружив их функциональную

роль в формировании хронического воспаления [116], приводящего к онкологии и аутоиммунным заболеваниям [36;191;205], таким как ревматоидный артрит, воспалительные заболевания кишечника, рассеянный склероз, астма, псориаз, а также диабет и гепатит. IL-17A и IL-17F преимущественно воздействуют на эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки, синовиоциты, мышечные клетки, фибробласты, кератиноциты, Т-клетки, В-клетки и макрофаги [147;191;256]. Однако, первоначальная функция интерлейкинов семейства IL-17 – активация иммунной защиты организма от патогенных бактерий и грибов [122;191]. На сегодняшний день подмножество Th17-клеток широко известно как связывающее звено между врожденным и адаптивным иммунитетом.

У IL-17 были обнаружены проангиогенные свойства [237] – цитокин стимулирует синтез фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), трансформирующий фактор роста (TGF- β), фактор роста фибробластов (FGF- β), Ang-2. IL-17 также оказывает значительное влияние на экспрессию и высвобождение металлопротеиназ [138;173;267], которые, в свою очередь, вызывают деградацию внеклеточного матрикса, способствуя тем самым миграции клеток и инвазии с последующим метастазированием. Первоначально предполагалось, что IL-17 напрямую действует на пролиферацию опухолевых клеток, однако позже было обнаружено его опосредованное влияние на прогрессирование рака: результаты исследований показали, что для дифференцировки Th17-лимфоцитов, синтеза и проопухолевой активности IL-17 необходимо наличие IL-6 (рисунок 9) [191]. В частности, дифференцировка Th17-клеток регулируется тем же фактором транскрипции, благодаря которому обеспечивается механизм работы самого IL-6 – STAT 3 [57;254]. Присутствие антител к IL-6 ингибировало IL-17-индуцированную активацию сигнального пути STAT 3 на линии раковых клеток человека, тем самым предотвращая развитие опухоли. Кроме того, было доказано, что IL-17 также стимулирует синтез IL-6 и активирует сигнальный путь STAT 3 – таким образом, в системе регуляции IL-17 – IL-6, а также в системе IL-17 – STAT-3 имеет место механизм положительной обратной связи. В 2009 году в исследованиях Wang и соавторов [254] было показано, что в случае меланомы, одной из наиболее агрессивных опухолей, наблюдалась повышенная концентрация IL-17 в крови и тканях опухоли, а в 2015 году в исследованиях Pan B. и соавторов [206;207] результаты были подтверждены в исследовании немелкоклеточного рака легких – сывороточный уровень IL-17 у пациентов был так же повышен. Инфильтрирующие опухоль Th17-клетки, являясь частью микроокружения злокачественного новообразования, были далее зарегистрированы в исследованиях других видов рака, таких как рак молочной железы, толстой кишки, желудка, яичников, печени, поджелудочной железы, почек, предстательной железы [154]. В доклинических исследованиях, у мышей, нокаутных по IL-17, наблюдалась повышенная устойчивость к росту опухоли, что указывает на то, что IL-17 способствует развитию злокачественных новообразований [251].

Однако результаты клинических исследований до сих пор сильно отличаются и обнаруживают диаметрально противоположные воздействия IL-17 на выживаемость [134] – некоторые исследователи определили благоприятный прогноз при повышенном уровне IL-17 [109;170;179;255], другие ученые подтвердили худшую выживаемость [115;133;167;173;177]. Тем не менее, Th17-хелперные клетки, которые первоначально были обнаружены и изучены лишь в случаях аутоиммунных заболеваний, в настоящее время признаны одними из ключевых типов клеток, способствующих развитию онкологии.

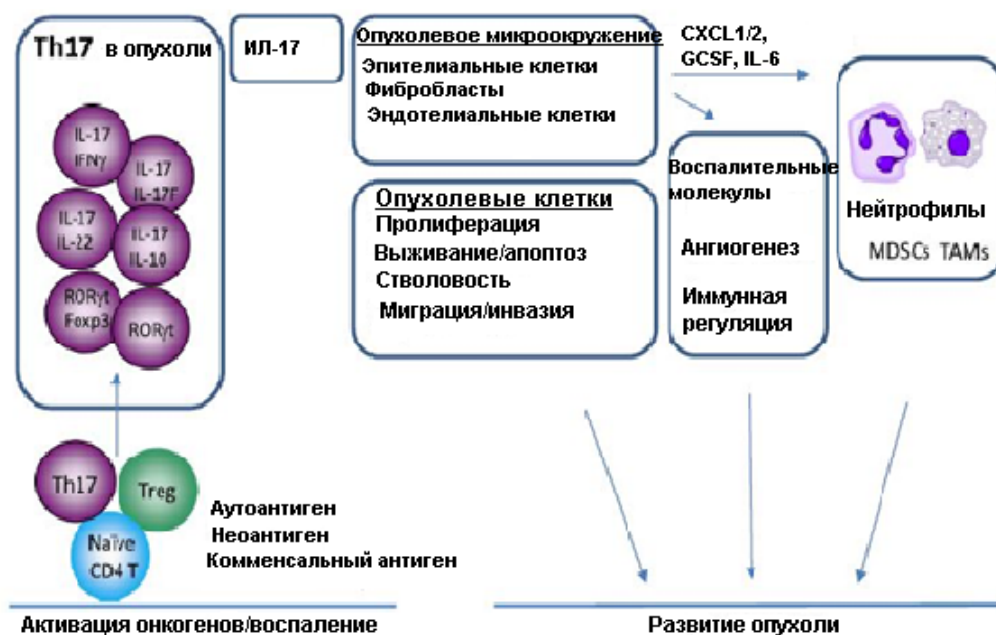


Рисунок 9. Механизм работы IL-17 [103].

1.7. Интерлейкин-10

В начале 1990-х годов исследовательская группа под руководством Tim R. Mossman [121;194] изолировала и охарактеризовала ранее неизвестное соединение, которое значимо ингибировало производство IL-2 и IFN- γ , благодаря чему первоначально был назван фактором, ингибирующим синтез цитокинов. IL-10 представляет собой гетеродимер V-образной структуры весом 37 кДа [263]. Каждый мономер имеет молекулярный вес 18,5 кДа и состоит из шести α -спиралей. Все представители семейства IL-10 являются цитокинами II класса, то есть имеют структурные характеристики, схожие с интерферонами II типа (например, IFN- γ). Все представители семейства IL-10 взаимодействуют с двумя видами рецепторов - IL-10R1 (IL-10RA) и IL-10R2 (IL-10RB): большинство клеток человеческого организма (фибробласты, эпителиальные клетки) экспрессируют IL-10R2, кроме кроветворных, экспрессирующих на своей поверхности IL-10R1 [195]. Связывание IL-10 с соответствующим рецептором рекрутирует тирозинкиназы

JAK1 и Tyk2. Последующая активация STAT 3 приводит к его гомодимеризации и транслокации в ядро [112;195].

IL-10 является Th2-цитокином, который подавляет активность оппозитных Th1-лимфоцитов и синтез соответствующих цитокинов (IFN- γ , IL-2, TNF). На модели карциномы легкого Lewis было показано [136], что индуцированный опухолью IL-10 блокирует Th1-иммунный ответ, обусловленный, в основном, действием IFN- γ . Было обнаружено, что IL-10 противодействовал действию IFN- γ на путь PD1/PDL1, что приводило к устойчивости опухоли к иммунотерапии анти-PD1/PDL1 [248]. Согласно результатам исследований экспрессия IL-10 в клетках Т-клеточной лимфомы (LSA) у сингенных мышей C57BL/6 значительно увеличивала размер опухоли LSA: по мнению авторов, подавление вырабатываемого Т-клеточной лимфомой IL-10 может иметь значительный потенциал при ее лечении [136]. Основным источником IL-10 в здоровом организме, помимо лимфоцитов типа Th2, также являются моноциты [182], M2-макрофаги [94], В-лимфоциты [209], дендритные клетки [107], тучные клетки [176], эозинофилы [200], кератиноциты [118], однако IL-10 относится к числу медиаторов, продуцируемых и малигнизированными клетками. Было показано, что IL-10 играет критическую роль в подавлении противоопухолевого иммунитета, тем самым способствуя росту опухоли и метастазированию. В частности, ассоциированные с опухолью макрофаги (ТАМ), в особенности M2-типа, вызывающие иммуносупрессию и обеспечивающие подходящую среду для прогрессирования рака, продуцируют высокие уровни IL-10 [7], чья концентрация, согласно данным клинических исследований [253], коррелирует с отсутствием ответа на противоопухолевую терапию.

IL-10 является плейотропным цитокином по биологическим эффектам, которые включают следующее: 1) подавление синтеза всех основных провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12), а также IFN- γ , TNF- α [94;102;150], 2) ингибирование антигенпрезентирующей функции, созревания и дифференцировки у дендритных клеток, макрофагов, моноцитах [25; 182;220], 3) подавление пролиферации Т-лимфоцитов, дифференциации и активации дендритных клеток [102;234;240], 4) стимуляция пролиферации и цитотоксичности НК-клеток [192; 193]. Было проведено множество фундаментальных исследований для оценки влияния IL-10 на развитие онкологического процесса. Большинство экспериментов было проведено *in vitro*, несколько *in vivo*. В ходе исследований были получены достаточно противоречивые данные – обнаруживалась как противоопухолевая [90;116;127;168;169;264], так и проонкогенная активность [124;162;219; 235]. Тем не менее, содержание IL-10 в сыворотке крови онкопациентов является одним из факторов, прогнозирующих дальнейшее течение заболевания: высокие концентрации IL-10 в макрофагах, ассоциированных с опухолью (ТАМ-макрофагах), коррелируют со

стадией, размером опухоли, лимфо-сосудистой инвазией и предполагают менее благоприятный прогноз, чем у больных с низким содержанием IL-10.

Кроме того, IL-10 имеет сложные отношения с многочисленными медиаторами, участвующими в онкогенезе. Накоплены доказательства существования связи между IL-10 и ЦОГ-2, простагладином PG E2 [117;145;213]. Было обнаружено, что мононуклеарные клетки и нейтрофилы из периферической крови человека, обработанные IL-10, ингибируют синтез PG E2 [201; 211]. Аналогично было выявлено, что IL-10 способен снижать продукцию ЦОГ-2 [201]. Группа ученых во главе с Patel S. в 2012 году обнаружила, что синтез IL-10 регулировался с помощью COX-2 через ERK и p 38 у пациентов с НМРЛ [208].

Согласно результатам исследований, IL-10 также усиливает экспрессию ростового фактора TGF- β как в нормальных клетках [257], так и в раковых [153]. Кроме того, было обнаружено, что IL-10 усиливает экспрессию рецептора к TGF- β , тем самым повышая чувствительность к цитокину [108]. В системе IL-10 – TGF- β наблюдается механизм положительной обратной связи: было показано, что TGF- β , в свою очередь, увеличивает синтез IL-10 в различных моделях, включая аллергическую астму [260] и рак шейки матки [104].

Немало исследований было посвящено влиянию IL-10 на фактор роста VEGF и, соответственно, на развитие ангиогенеза. Исследования Matsumoto K. и соавторов показали [187], что IL-10 снижает уровень VEGF дозозависимым образом, синергически взаимодействуя с IL-4 и IL-13 для усиления ингибирования фактора роста и подавления неоангиогенеза. Авторы других исследований наблюдали [232], что у мышей с дефицитом IL-10 уровень VEGF на 80% выше по сравнению с таковым у контрольных животных. Некоторые исследователи, однако, сообщили об обратном влиянии IL-10 на продукцию VEGF и неоваскуляризацию тканей: группа ученых во главе с Trompezinski S. обнаружила [245], что IL-10 не снижает экспрессию VEGF в активированных кератиноцитах человека; в исследованиях Dase D.S. продемонстрировано [111], что IL-10 способствует ангиогенезу сетчатки путем повышения экспрессии VEGF на мышинной модели ретинопатии, индуцированной кислородом.

Таким образом, IL-10 имеет сложные механизмы взаимодействия со многими медиаторами, участвующими в онкогенезе, и многие из них еще недостаточно изучены.

1.8. Пиримидины

Пиримидины выполняют важнейшие функции в метаболизме человека в качестве рибонуклеотидных оснований в РНК (урацил и цитозин), дезоксирибонуклеотидных оснований – в ДНК (цитозин и тимин) и связанных фосфодиэфирным мостиком пуриновых нуклеотидов в двухцепочечную ДНК как в ядре, так и в митохондриях. Важность путей пиримидинового метаболизма в физиологии человека в норме и повышение их активности при злокачественных процессах делает их идеальными объектами для фармакологического вмешательства, а также

самостоятельным перспективным классом соединений для создания лекарственных препаратов [55; 149;171;178;217].

Так называемые простые пиримидины, оротовая кислота, уридин, метилурацил и пентоксил усиливают в макрофагах синтез и продукцию ферментов, стимулируют фагоцитоз. Метилурацил был первым препаратом, описанным Н.В. Лазаревым, основателем лекарственной группы адаптогенов. Данный препарат обладает интерферон-индукторной активностью, стимулирует процессы пролиферации В-лимфоцитов и усиливает синтез антител плазматическими клетками. Фагоцитоз-стимулирующий эффект метилурацила связан с его способностью повышать активность сукцинатдегидрогеназы, α -ГФДГ. Метилурацил не включается в обмен в качестве предшественника пиримидиновых нуклеотидов ДНК и РНК, его действие, как и у пентоксила, связано с угнетением уридинфосфатазы и, как следствие, повышения уровня Д-тимидинмонофосфата, контролирующего синтез ДНК, в связи с этим ускоряется репликация ДНК и клеточное деление. Обмен РНК активируется слабее, чем у оротата калия. Оротовая кислота способствует накоплению пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот в клетке, облегчая синтез ДНК, РНК и клеточное деление. Данная группа препаратов обладает поликомпонентным механизмом действия и показана при лечении вторичных иммунодефицитов, лейкопении, в терапии язвенной болезни, а также местно при лечении ран и ожогов для ускорения репарации поврежденных тканей.

Соединения, имеющие в своей структуре пиримидиновое кольцо, занимают ведущее положение в ряду антиканцерогенных препаратов [60;68;76;91;259]. По механизму действия пиримидиновые противоопухолевые препараты делятся на антиметаболиты (фторафур (рисунок 10)), алкилирующие средства (допан), ингибиторы ферментов (иматиниб, nilотиниб) и противоопухолевые антибиотики (блеомицин). Антиметаболиты в клетке превращаются в дезоксирибозиды, конкурирующие с нормальными нуклеозидами. Имитируя эти субстраты, антиметаболиты трансформируют и изменяют функции ДНК, приводя к апоптозу опухолевых клеток. Антиметаболическим действием обладают фторурацил (5-FU), цитарабин, капецитабин, гемцитабин [68].

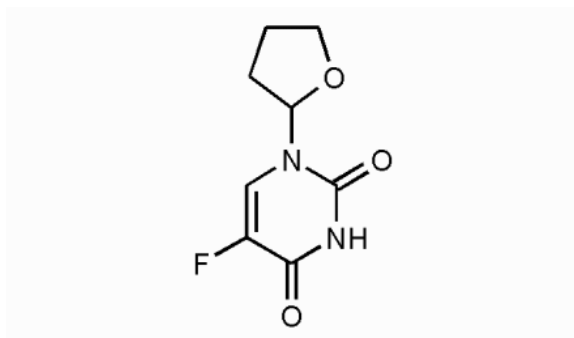


Рисунок 10. Химическое строение тегафура [68].

5-FU (он же тегафур) был создан в 1967 году в Институте органического синтеза Латвии и затем куплен фирмами Японии. Противоопухолевый эффект 5-FU определяется его превращением в три активных метаболита:

1) Формы фтородезоксисуридин монофосфата (FdUMP) и необратимый тройной комплекс с тимидилат-синтазой и кофактором фолата 5,10-CH₂THF. Присутствие фолатного кофактора поддерживает стабильность третичного комплекса. Поскольку количество фолата часто неоптимально для поддержания стабильности третичного комплекса, введение фолиевой кислоты (лейковорин, LV), сопутствующей 5-FU, благоприятствует этому цитотоксическому механизму;

2) Фтородезоксисуридин трифосфат (FdUTP) может быть включен непосредственно в ДНК с помощью ДНК-полимеразы вместо дезоксиуридина трифосфата (dUTP), вызывая прямое повреждение;

3) Фторуридин трифосфат (FUTP) также включается непосредственно в РНК, ингибируя процессинг прерибосомальной РНК в зрелой рибосомальной РНК [140] (рисунок 11).

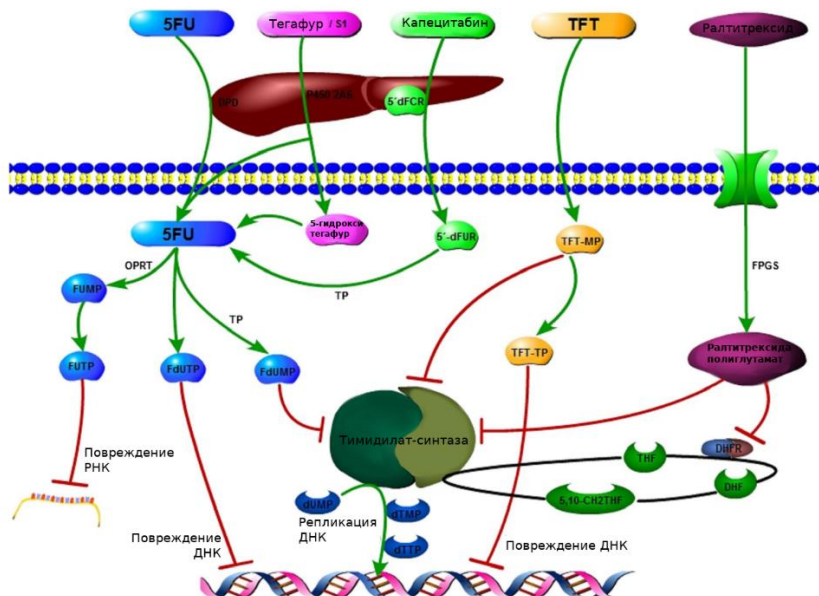


Рисунок 11. Механизм действия противоопухолевых антиметаболитов [140].

Такое усиление действия носит название самопотенцирования – увеличение собственного влияния за счет образования сразу трех активных метаболитов. 5-фторурацил (5-FU) и пероральное пролекарство капецитабин (CAPE, Кселода) были основными компонентами многих схем химиотерапии с 1962 года с одобрения Управления по контролю за продуктами и лекарствами (FDA) – у 154 000 пациентов ежегодно [247]. Препарат обладает высокой биодоступностью и хорошо всасывается в желудочно-кишечный тракт, поэтому может применяться перорально. Активность 5-фторурацила снижается вследствие его разложения ферментом дигидропиримидиндегидрогеназой (DPD), для преодоления эффекта DPD и усиления противоопухоле-

вой активности тегафур применяют одновременно с урацилом в одной лекарственной форме (препарат UFT фирмы Merck KGaA, широко применяется в Японии уже более 30 лет) [69]. Препарат все еще остается важным компонентом схем химиотерапии при опухолях пищеварительного тракта, особенно при метастатической колоректальной карциноме, адъювантная химиотерапия на основе тегафура улучшает общую и безрецидивную выживаемость, однако только 5-20% случаев отвечают на терапию [4;199]. 10 лет назад было замечено, что кроме прямого цитотоксического действия фторурацилы оказывают опосредованное влияние – повышают иммуногенность ряда опухолей, что, возможно, обусловлено воздействием препарата на клеточный цикл, повышая экспрессию опухолевых антигенов на поверхности клетки. Это приводит к распознаванию иммунными клетками малигнизированных клеток и активации противоопухолевого иммунного ответа [75]. Наиболее частые побочные эффекты фторпиримидинов связаны с метаболитами 5-FU. Синдром кисти-стопы, также известный как акральная эритема, связан с продуктами опосредованного катаболизма 5-FU. Желудочно-кишечная токсичность, которая может привести к тошноте, рвоте и диарее, связана с метаболитом 5-FU, фосфорилированным в тонком и толстом кишечнике с помощью оротата фосфорибозилтрансферазы. Один из самых тяжелых побочных эффектов, кардиотоксичность, обычно проявляется в виде стенокардической боли в груди, в механизме которого лежит коронарный спазм сосудов и токсическое воздействие метаболитов на миоциты. Побочный эффект обратим при прекращении лечения, чаще проявляется при высоких дозах и при постоянном режиме инфузии [140;151]. Для снижения кардиотоксичности применяют дексразоксан (кардиоксан), однако четкие показания и схемы назначения не определены [71].

Капецитабин - пероральный фторпиримидиновый препарат, превосходит фторурацил благодаря непосредственному превращению в 5-фторурацил внутри клетки, являясь пероральным пролекарством [259]. Гемцитабин (гемзар), новый препарат из группы аналогов цитидина, как и капецитабин, превращается в активные метаболиты внутри клетки.

Гемцитабин (рисунок 12) метаболизируется в клетке под действием нуклеозидкиназ до активных метаболитов – дифосфатных и трифосфатных нуклеозидов. Дифосфат ингибирует фермент рибонуклеотидредуктазу, являющуюся катализатором реакции образования дезокси-нуклеозидтрифосфата для синтеза ДНК, а трифосфат способен встраиваться в ДНК и РНК, конкурируя с нуклеотидами, подавляя репликацию и приводя к апоптозу опухолевой клетки [68]. Гемцитабин, действуя на опухолевые клетки в фазах S и G1/S, активно используется при мелкоклеточном и немелкоклеточном раке легких, входит в комбинации противоопухолевой химиотерапии при раке шейки матки и яичников. В последнее время стали использовать при почечно-клеточном раке и раке поджелудочной железы, включая заболевания на последних стадиях [48;76]. Однако одним из наиболее частых побочных действий вещества Гемцитабин явля-

ется гриппоподобный синдром (повышение температуры тела, лихорадка, миалгия, астения, анорексия, головная боль, озноб), развивающийся через несколько часов после введения препарата, длится 1-2 суток и обратим после прекращения лечения [35]. Ввиду умеренной токсичности, гемцитабин часто назначается пожилым онкопациентам в качестве монотерапии.

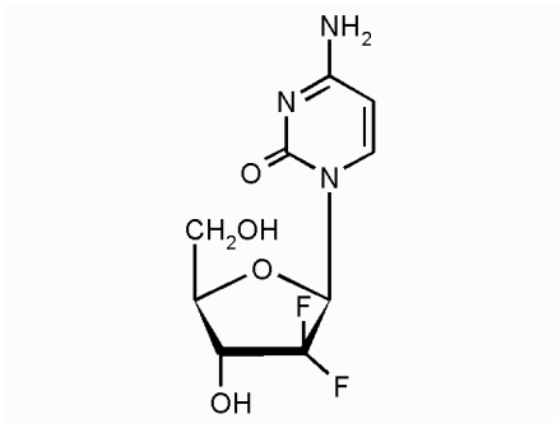


Рисунок 12. Химическое строение гемцитабина [68].

Высокой эффективностью в лечении поражений центральной нервной системы при острых лейкозах обладает цитарабин (рисунок 13) – антагонист пиримидина. Противоопухолевая активность обусловлена активным метаболитом цитарабинтрифосфатом, который ингибирует ДНК-полимеразу и тормозит синтез ДНК. Кроме того, вещество обладает выраженным иммуносупрессивным действием [68].

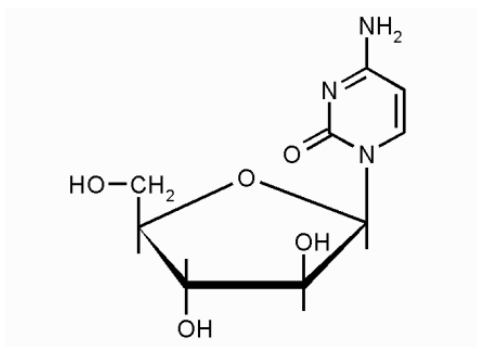


Рисунок 13. Химическое строение цитарабина [68].

В дальнейшей перспективе, поднимается вопрос о необходимости определить, нарушения функций каких ферментов пиримидинового метаболизма обуславливают наиболее общие клинические ситуации (например, аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит, злокачественные опухоли или инфекции), и разработать усовершенствованные аналоги пиримидинов, воздействующие на эти нарушения [178]. Перспективные, но пока не внедренные в клиническую практику производные пиримидинов оказывают также действие на циклинзависимые киназы, диацетилазы гистонов, эпидермальный фактор роста [144;142;161].

Глава 2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Экспериментальные животные

В работе были использованы самцы мышей линии C57Bl/6, CBA, гибриды F₁(CBA×C57Bl/6) и самки линии CBA массой 18-20 г, нелинейные крысы-самцы массой 140-160 г, самцы морских свинок-альбиносов массой 250-300 г, полученные из сертифицированного питомника «Филиал Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животные содержались на стандартном полнорационном брикетированном корме со свободным доступом к воде и пище в контролируемых условиях окружающей среды: при 20-24°C, 45-65% относительной влажности и 12-ти часовом цикле освещения. Все эксперименты были рассмотрены и утверждены комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» и были проведены в соответствии с международными правилами Руководства «Guide for the care and use of laboratory animals (ILAR publication, 2011, National Academy press)».

Общее количество использованных в работе животных составило: 665 мышей, 70 крыс, 56 морских свинок. Условия содержания животных соответствуют требованиям, указанным в Межгосударственном стандарте РФ ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

2.2. Опухолевые клеточные линии и штаммы

Опухолевые клеточные линии эпидермоидной карциномы легкого Lewis (LLC) и рака шейки матки РШМ-5 для исследований *in vivo* были получены из банка глубоководнозамороженных опухолевых культур ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина и поддерживались перевиванием опухолевой культуры на мышах различных линий в соответствии с методическими рекомендациями [78].

2.3. Исследуемые агенты

Соединение СНК-411 (2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин) с выраженными противоопухолевыми и иммуномодулирующими свойствами было синтезировано в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» и запатентовано (патент РФ 2518889 от 10.06.2014) [70]. В соответствии с классификацией токсичности веществ К.К. Сидорова (1973 г.), соединение СНК-411 является малотоксичным и относится к 4 классу токсичности, а также к 3 классу опасности для перорального способа введения в соответствии с ГОСТ 12.1.007-16.

Соединение СНК-578 (хлоргидрат 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин), обладающее противоопухолевой и антиметастатической активностью, а также с выраженными противовоспалительными и противоаллергенными свойствами, было синтезировано в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» и запатентовано (патент РФ 2686672 от 30.04.2019) [28].

Согласно классификации токсичности веществ К.К. Сидорова (1973 г.), соединение СНК-578 является малотоксичным и относится к 4 классу токсичности.

2.4. Препараты для верификации используемых моделей

Диклофенак (диклофенак натрия, Немофарм, Сербия) - нестероидное противовоспалительное лекарственное средство (регистрационный номер № П N011648/03).

Доксорубин-Эбеве (доксорубин гидрохлорид, ЭБЕВЕ Фарма Гес.м.б.Х.НФГ.КГ, Австрия) – противоопухолевое средство, антибиотик антрациклинового ряда (регистрационный номер № П N015188/01).

2.5. Материалы

- гепарин (ЭЛЬФА Лабораториз, Индия)
- диклофенак (Немофарм, Сербия)
- диметилсульфоксид (ДМСО) (Биолот, Россия)
- доксорубин (ЭБЕВЕ Фарма Гес.м.б.Х.НФГ.КГ, Австрия)
- зимозан (Диаэм, Россия)
- каррагенан (Sigma-Aldrich, США)
- конканавалин А (Sigma-Aldrich, США)
- люминол ч.д.а. (Диаэм, Россия)
- 2-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich, США)
- питательная среда RPMI-1640 (Биолот, Россия)
- раствор белка куриного яйца (овальбумина)
- раствор натрия хлорида для инфузий 0,9% (ОАО НПК “Эском”, Россия)
- раствор фиккола Histopaque с плотностью 1,077 г/см³ (ПакЭко, Россия)
- раствор фиккола Histopaque с плотностью 1,09 г/см³ (ПакЭко, Россия)
- раствор Хенкса (ПанЭко, Россия)
- спектрофотометр (Awareness Technology Inc, Австрия)
- супрастин (EGIS Pharmaceuticals PLC, Венгрия)
- счетчик клеток автоматический TC 20 (BIO RAD, Великобритания)
- тиопентал натрия
- трипановый синий 0,4 % (BIO RAD, Великобритания)
- тушь черная, суспензия 0,05% (ОАО Гамма, Россия)
- фотометр люминесцентный БЛМ-3607М1 (Россия)
- центрифуга 5804R (Eppendorf, Германия)
- цитофлуориметр лазерный BD FACSCanto II (Becton Dickinson and Company, США)
- штангенциркуль двусторонний цифровой с глубиномером ШЦЦ-1-125-0.01 (Micron, Чехия)

-эмбриональная телячья сыворотка (Биолот, Россия)

-эритроциты барана (ЭКОлаб, Россия)

- Multi-Analyte Flow Assay Kit (assay buffer – стоковый буфер, custome mouse 10 plex detection antibodies – антитела для конъюгирования с интерлейкинами, fluorescent beads coated with specific antibodies (m IL-5, IFN- γ , IL-6, IL-4, IL-11, IL-17A, IL-13, IL-17F, IL-2, IL-10) – субпопуляции полимерных флюоресцентных частиц, покрытых специфичными антителами к каждому из интерлейкинов, matrix B lyophilized – лиофилизированный межклеточный матрикс для стабилизации сыворотки, PE beads – частицы с фикоэритрином, SA-PE – стрептовидин, конъюгированный с фикоэритрином, Setup beads – полимерные частицы для настройки параметров светорассеивания на проточном цитометре, wash buffer – промывочный буфер) (BioLegend, США)

-Mouse Th1/Th2 10plex Kit (assay buffer – стоковый буфер, anti-m. antibodies/biotin – антитела для конъюгирования с интерлейкинами, fluorescent beads coated with specific antibodies (anti-m. IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α Beads) – субпопуляции полимерных флюоресцентных частиц, покрытых специфичными антителами к каждому из интерлейкинов, SA-PE – стрептовидин, конъюгированный с фикоэритрином, Setup beads – полимерные частицы для настройки параметров светорассеивания на проточном цитометре) (eBioscience, Австрия)

2.6. Иммунофармакологические методы

В исследованиях использовались методы оценки иммунофармакологической активности веществ в соответствии с рекомендациями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Глава 2. М.: ОАО «Издательство “Медицина”, 2005).

2.6.1. Исследование гуморального иммунного ответа в реакции пассивной гемагглютинации на тимусзависимый антиген (эритроциты барана)

Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) основана на способности антител, содержащихся в сыворотке крови иммунизированных животных, агглютинировать эритроциты барана (ЭБ), используемые в качестве антигена. Опыты были проведены на мышях самцах линий СВА и С57В1/6 массой 18-20 г, оппозитно реагирующих на эритроциты барана (ЭБ). Объем введения растворов исследуемых соединений во всех экспериментах по изучению иммуотропной активности составил 0,2 мл/20 г массы тела мыши. После 3х-дневного в/б введения изучаемых соединений (СНК-578 в дозах 10 мг/кг и 25 мг/кг; СНК-578 в дозе 10 мг/кг + доксорубицин в дозе 4 мг/кг однократно; доксорубицин в дозе 4 мг/кг однократно) в/б вводили суспензию трижды отмытых в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида ЭБ в субоптимальной дозе, равной 5×10^7 ЭБ/мышь.

Через 7 дней после иммунизации животных выводили из эксперимента декапитацией и получали сыворотку крови согласно методическим указаниям по изучению иммуотропной активности фармакологических веществ [85].

Для инактивации комплемента сыворотку крови прогревали при температуре 56°C в течение 30 минут, далее сыворотку от каждой мыши делили на две равные части, одну из которых обрабатывали 0,2М раствором 2-меркаптоэтанола для определения IgG и IgM антител. Для определения титра гемагглютининов в лунки микротитратора Такачи микропипетками закапывали физиологический раствор. В первую лунку закапывали такое же количество сыворотки и специальным дозатором после перемешивания с физиологическим раствором переносили разведённый образец из одной лунки в другую. Затем в каждую лунку микропипеткой добавляли ЭБ в концентрации 2×10^8 клеток. Планшеты осторожно встряхивали и ставили в термостат на 2 часа при температуре 37°C. Титр антител (наибольшее разведение сыворотки, при котором наблюдается отчётливая агглютинация ЭБ) выражали величиной $\log_2 T$, где T – титр антител исследуемой сыворотки.

2.6.2. Исследование клеточного иммунного ответа в реакции гиперчувствительности замедленного типа

Опыты были проведены на самцах мышей-гибридов F₁(CBA×C57BL/6) массой 18-20 г. После трехкратного введения изучаемых соединений (СНК-578 в дозах 10 мг/кг, 25 мг/кг; СНК-578 в дозе 10 мг/кг + доксорубицин в дозе 4 мг/кг однократно; доксорубицин в дозе 4 мг/кг однократно) мышам вводили подкожно суспензию трижды отмытых в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида ЭБ в дозе, равной 1×10^7 ЭБ/мышь, в объёме 100 мкл. Разрешающую дозу антигена, 1×10^8 ЭБ в объёме 20 мкл, вводили на 5 день после сенсibilизации под апоневротическую пластинку правой задней конечности, в контрлатеральную лапу – соответственно 20 мкл физиологического раствора в соответствии с методическими указаниями по оценке иммунотоксического действия фармакологических средств. Учёт интенсивности воспалительной реакции проводили через 24 часа после разрешающей дозы антигена. Мышей подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации, обе лапы отрезали на уровне голеностопного сустава и взвешивали их на торсионных весах.

Индекс реакции (I_p) подсчитывали по формуле:

$$I_p = \frac{P_{оп} - P_k}{P_k} \times 100\% , \text{ где}$$

$P_{оп}$ – масса стопы задней лапы, в подушечку которой вводили ЭБ; P_k – масса стопы контрольной лапы.

2.6.3. Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов

Опыты были проведены на самцах мышей-гибридов F₁(СВА×С57ВL/6) массой 18-20 г. После трехкратного в/б введения изучаемых соединений (СНК-578 в дозах 10 мг/кг, 25 мг/кг; СНК-578 в дозе 10 мг/кг + доксорубицин в дозе 4 мг/кг однократно; доксорубицин в дозе 4 мг/кг однократно) через 24 часа оценивали фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов по интенсивности захвата ими частиц туши, введенной животным в/б в виде 0,05% суспензии в объеме 2 мл. Через 10 минут в брюшную полость вводили 5 мл изотонического раствора хлорида натрия согласно методическим указаниям по оценке иммунотоксического действия фармакологических средств [84]. Затем мышей выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации, разрезали ножницами брюшную полость, не повреждая сосуды, и собирали экссудат в пробирки. Полученные таким образом клетки перитонеального экссудата разбавляли изотоническим раствором хлорида натрия до 10 мл и отмывали центрифугированием 10 минут при 300 g, повторяли процедуру дважды. Осадок ресуспендировали в 1-2 мл физиологического раствора, подсчитывали концентрацию ядросодержащих клеток и процент фагоцитирующих клеток. Далее клетки осаждали центрифугированием, супернатант удаляли, а осадок клеток перитонеального экссудата (КПЭ) лизировали дистиллированной водой. Лизаты КПЭ помещали в плоскодонные планшеты и определяли с помощью спектрофотометра при длине волны 620 нм оптическую плотность, отражающую количество туши, поглощенной перитонеальными фагоцитами.

Результаты выражали в условных единицах, отражающих оптическую плотность лизата КПЭ, отнесенную к количеству фагоцитирующих клеток:

$$ФИ = \frac{D_{образца} - D_{H_2O}}{N_{ф.кл}}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность 100 мкл образца; D – оптическая плотность 100 мкл дистиллированной воды; N_{ф.кл.} – количество макрофагов, вступивших в фагоцитоз и содержащихся в 100 мкл экссудата.

2.6.4. Определение массы и концентрации ядросодержащих клеток органов иммунной системы

Опыты проведены на мышях гибридах F₁(СВА × С57ВL/6) массой 18-20 г. Животным опытных групп трехкратно в/б вводили соединения СНК-578 в дозах 10 мг/кг и 25 мг/кг, доксорубицин в дозе 4 мг/кг и комбинацию СНК-578 в дозе 10 мг/кг с доксорубицином в дозе 4 мг/кг, затем подсчитывали массу лимфоидных органов и количество ядросодержащих клеток (ЯСК).

Мышей выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации и взвешивали на технических весах. Затем извлекали тимус, селезёнку и подколенные лимфатические узлы.

Лимфоидные органы взвешивали на торсионных весах. С помощью стеклянного гомогенизатора готовили клеточную взвесь лимфоидных органов в растворе Хенкса. Полученную суспензию фильтровали через 2 слоя капрона и дважды отмывали путем центрифугирования при 200 g в течение 5 минут. После последнего центрифугирования образцы ресуспендировали рабочим раствором до 10 мл. Отбирали 10 мкл клеточной суспензии, затем ее переносили в 96-луночный планшет, к образцу добавляли 10 мкл 0,4% раствора трипанового синего и пипетировали в соответствии с методическими указаниями по оценке иммунотоксического действия фармакологических средств [84]. Вносили 10 мкл клеточной суспензии, окрашенной трипановым синим, в рабочую камеру на слайде. Затем слайд вставляли в разъем на передней панели, подсчет клеток начинался автоматически. В течение 30 секунд прибор определяет общее количество клеток/мл, детектирует присутствие красителя и определяет количество и долю жизнеспособных клеток.

2.6.5. Оценка генерации активных форм кислорода методом люминол-зависимой клеточной хемилюминесценции

Опыты были проведены на самцах мышей-гибридов F_1 (CBA \times C57BL/6) массой 18-20 г. Параметры хемилюминесценции (ХЛ) нейтрофильных гранулоцитов были исследованы после трехкратного в/б введения СНК-578 в дозах 10 мг/кг и 25 мг/кг, доксорубина в дозе 4 мг/кг и комбинации СНК-578 в дозе 10 мг/кг с доксорубином в дозе 4 мг/кг, СНК-411 в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг.

В качестве источника нейтрофилов была использована гепаринизированная кровь мышей-гибридов F_1 (CBA \times C57BL/6), полученная после декапитации животных. С целью выделения фракции нейтрофилов кровь наслаивали на двойной градиент плотности (Histopaque 1,077 г/см³ и Histopaque 1,119 г/см³) и центрифугировали в течение 30 минут при 700g. После центрифугирования лейкоциты собирали с границы раздела фаз и трижды отмывали раствором Хенкса (рН=7,4), затем центрифугировали 10 минут при 400 g. После последней отмывки осадок ресуспендировали в 1 мл раствора Хенкса и подсчитывали ядродержащие клетки (ЯСК), оценивали жизнеспособность клеток в тесте окрашивания трипановым синим на автоматическом счетчике клеток BioRad TC10.

Генерацию активных форм кислорода (АФК) в суспензии нейтрофильных гранулоцитов оценивали методом люминол-зависимой клеточной хемилюминесценции. Использовали люминол, неспецифический хемилюминесцентный зонд, что позволяет оценить активность свободнорадикальных продуктов. В качестве стимулятора ХЛ применялся опсонизированный сывороткой мышей различных линий (CBA, C57BL/6 и BALB/c) зимозан согласно методическим указаниям по оценке иммунотоксического действия фармакологических средств [84].

ХЛ регистрировали на люминесцентном фотометре БЛМ-3607М1 при постоянном перемешивании и температуре $t=+37^{\circ}\text{C}$. Среда измерения включала 130 mM NaCl, 5 mM глюкозы, 5

mM KCl, 1,5 mM MgSO₄, 0,5 mM Na₂HPO₄, 0,5 mM KH₂PO₄, 4 mM NaHCO₃, 1mM CaCl₂, 0,65 mM люминола (pH=7,4). Общий объем кюветы для измерения составлял 1 мл. В кювету прибора помещали люминольную среду и клеточную взвесь в таких объемах, чтобы конечная концентрация нейтрофилов составляла 8×10^5 кл/мл. Спонтанный уровень ХЛ измерялся в течение 1 минуты, затем к содержимому кюветы добавляли 10 мкл опсонизированного зимозана в концентрации 10 мг/мл.

При регистрации ХЛ учитывали следующие параметры:

$I_{\text{сп.}}$ – максимум спонтанной вспышки ХЛ;

$I_{\text{макс.}}$ – максимальная величина ХЛ после добавления стимула;

ΔI – интенсивность стимулированной ХЛ (разница между $I_{\text{макс.}}$ и $I_{\text{сп.}}$);

S – интегральный показатель светосуммы ХЛ за 20 минут после добавления зимозана;

$t_{\text{макс.}}$ – время достижения максимальной интенсивности ХЛ после добавления стимула.

2.7. Методы исследования противовоспалительной и противоаллергенной активности соединений

В исследованиях использовались методы оценки противовоспалительной и противоаллергенной активности веществ в соответствии с рекомендациями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Глава 2, 3. М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005)

2.7.1. Острый экссудативный отек на каррагенан у крыс

Опыты проводили на аутбредных самцах крыс массой 140-160 г. Острую воспалительную реакцию воспроизводили субплантарным введением 0,1 мл 1% раствора каррагенана в соответствии с методическими указаниями по изучению новых нестероидных противовоспалительных препаратов [88]. В качестве референтного препарата сравнения была выбрана инъекционная форма препарата диклофенак, действующим веществом которого является диклофенак натрия. Референтный препарат вводили в дозе 10 мг/кг, что при перерасчете соответствует суточной дозе для человека.

Животным опытных групп за час до введения каррагенана вводили однократно в/б исследуемые соединения (диклофенак в дозе 10 мг/кг; СНК-578 в дозе 10 мг/кг; СНК-578 в дозе 10 мг/кг + доксорубицин в дозе 5 мг/кг, и СНК-411 в дозе 25 мг/кг + доксорубицин в дозе 4 мг/кг); животные контрольной группы в эти же сроки получали 0,9% NaCl в эквивалентном объеме. Для моделирования реакции воспаления на каррагенан каждой крысе в подушечку правой задней лапы вводили 0,1 мл 1% раствора каррагенана в 0,9% NaCl. В подушечку левой задней лапы вводили 0,1 мл 0,9% NaCl. Для количественной оценки отека лапы в течение 5 часов каждый час (0 час, 1 час, 2 час, 3 час, 4 час, 5 час) штангенциркулем цифровым ШЦЦ-1-125 (Micron, Чехия) измеряли диаметр обеих стоп крыс в области плюсны. По результатам измере-

ний рассчитывали индекс реакции воспаления. Выраженность реакции оценивали по изменению отечности лап животных опытной и контрольной группы в течение 5 часов. Индекс реакции воспаления (Ир) подсчитывали по формуле:

$$I_p = \frac{P_{оп} - P_{к}}{P_{к}} \times 100\% , \text{ где}$$

$P_{оп}$ – диаметр стопы задней лапы, в подушечку которой вводили каррагенан; $P_{к}$ – диаметр стопы задней лапы, в подушечку которой вводили 0,9% NaCl.

2.7.2. Реакция воспаления на конканавалин А

Реакция воспаления на конканавалин А (Кона) является псевдоаллергической и основана на способности соединения без реакции антиген-антитело высвобождать медиаторы воспаления. Опыт проводили на мышах самцах линии СВА массой 18-20 г. Каждая экспериментальная группа включала 10 животных. Животным опытных групп за час до введения Кона вводили однократно в/б исследуемые соединения (диклофенак в дозе 10 мг/кг; СНК-578 в дозах 10 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг; СНК-411 в аналогичных дозах), животные контрольной группы в эти же сроки получали 0,9% NaCl в эквивалентном объеме. Через 1 час мышам опытных и контрольной групп субплантарно, в подушечку задней стопы вводили Кона в дозе 100 мкг/20 г массы тела (20 мкл раствора в концентрации 5 мг/мл), в контралатеральную конечность – тот же объем изотонического раствора натрия хлорида. Через 1 час мышей подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации, определяли массу лап и подсчитывали Ир воспаления по формуле:

$$I_p = \frac{P_{оп} - P_{к}}{P_{к}} \times 100\% , \text{ где}$$

$P_{оп}$ – масса стопы задней лапы, в подушечку которой вводят Кона; $P_{к}$ – масса стопы задней лапы, в подушечку которой вводят изотонический раствор натрия хлорида.

2.7.3. Изучение противоаллергенной активности соединений методом реакции общей анафилактики на овальбумин в опытах на морских свинках альбиносах

При изучении аллергизирующих свойств была выбрана модель пероральной сенсибилизации интактных морских свинок-альбиносов 1% раствором белка куриного яйца (БКЯ), основным аллергическим компонентом которого является овальбумин. В предварительных экспериментах 6 интактным морским свинкам альбиносам внутрисердечно (в/с) вводили 1% раствор БКЯ, токсичных и анафилактикоидных реакций не выявлено. В первой серии опытов животным контрольной и опытной группы перорально вводили раствор БКЯ в дозе 1 мл на 250 г массы тела в течение трех дней (растворенный в физиологическом растворе БКЯ морским свинкам вводили через мягкий пластмассовый зонд). Через 12 дней после начала иммунизации БКЯ жи-

вотным опытной группы в течение трех дней в/б вводили СНК-411 в дозе 50 мг/кг или супрастин в дозе 50 мг/кг, контрольным животным – соответствующий объем физиологического раствора. На следующие сутки (16-ый день опыта) животным опытной группы в/б вводили СНК-411 в дозе 50 мг/кг или супрастин в дозе 50 мг/кг, контрольным животным - физиологический раствор. Через 1 час животным всех групп в/с вводили 0,3 мл 1% раствор БКЯ на 300 грамм массы тела, после чего регистрировали развитие анафилактической реакции и проводили вычисление анафилактического индекса по Weigle.

Иммунизация 1% раствором БКЯ приводила в контрольной группе к быстрой 100% гибели всех животных. Для получения системной реакции анафилаксии различной степени во второй серии опытов животных контрольной и опытных групп иммунизировали перорально 0,6% раствором БКЯ в течение трех дней, далее по аналогичной схеме вводили СНК-578 в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг.

2.8. Методы оценки противоопухолевой и антиметастатической активности соединений

В исследованиях использовались методы оценки противоопухолевой и антиметастатической активности веществ в соответствии с рекомендациями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Глава 3, Часть 4. М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005)

2.8.1. Модель злокачественной перевиваемой опухоли LLC in vivo

В качестве экспериментальной модели злокачественного роста была использована модель эпидермоидной карциномы легкого Lewis (LLC), штаммы опухолевых клеток получены из банка глубоководнозамороженных клеточных культур НИИ ЭДиТО РОНЦ имени Н.Н. Блохина. Данный тип опухоли неиммуногенный, метастазирует в легкие. Взвесь опухолевых клеток имплантировали мышам линии C57Bl/6 п/к в область подмышечной впадины по 30 мг в 0,5 мл раствора Хэнкса на одну мышь. Стандартная прививочная доза составляла не менее 3×10^6 клеток/мышь. День подкожной прививки клеток опухолевого штамма считали нулевым днем развития опухоли. Исследуемые соединения вводили внутрибрюшинно в течение 2-х недель со 2 по 15 дни развития LLC в переносимых дозах в стандартных режимах введения (рисунок 14). В качестве позитивного контроля и препарата для изучения совместного действия с производными 5-оксипириимидина применяли доксорубин гидрохлорид (ЭБВЕ Фарма Гес.м.б.Х.Нфг.КГ, Австрия) – антрациклиновый антибиотик, который интеркалирует в двойную спираль ДНК между парами азотистых оснований и вызывает расщепление ДНК вследствие образования свободных радикалов. Доксорубин вводили однократно на 2-й день развития опухоли в переносимой дозе, 4 мг/кг в/б (LD_{50} доксорубин гидрохлорида=10,8 мг/кг). Животных рандомизировали в следующие группы:

Группа 1. Активный контроль: модель LLC, 1% раствор крахмала, многократно, в/б, самцы мышей линии C57Bl/6, n=10;

Группа 2. Модель LLC и доксорубин в дозе 4 мг/кг, однократно, в/б, самцы мышей линии C57Bl/6, n=10;

Группа 3. Модель LLC и СНК-411 в дозе 25 мг/кг, многократно, в/б, самцы мышей линии C57Bl/6, n=10;

Группа 4. Модель LLC и СНК-411 в дозе 25 мг/кг, многократно, в/б, в комбинации с доксорубицином в дозе 4 мг/кг, однократно, в/б, самцы мышей линии C57Bl/6, n=10;

Группа 5. Модель LLC и СНК-578 в дозе 10 мг/кг, многократно, в/б, самцы мышей линии C57Bl/6, n=10;

Группа 6. Модель LLC и СНК-578 в дозе 10 мг/кг, многократно, в/б, в комбинации с доксорубицином в дозе 4 мг/кг, однократно, в/б, самцы мышей линии C57Bl/6, n=10.



Рисунок 14. Дизайн исследования противоопухолевых свойств СНК 411 и СНК 578 в модели перевиваемой эпидермоидной карциномы легкого Lewis у мышей.

2.8.2. Оценка противоопухолевой активности соединений в модели злокачественной перевиваемой опухоли LLC

Расчет объема опухоли проводили после измерения 3-х ее размеров по формуле: $V=A \times B \times C$, где - «А», «В» и «С» – размеры опухоли, соответственно, на 8 сутки развития LLC, 21 сутки (т.е. 7 сутки после окончания двухнедельного введения исследуемых веществ) и 28 сутки (т.е. 14 сутки после окончания двухнедельного введения исследуемых веществ).

Противоопухолевый эффект регистрировали на 8, 21 и 28 сутки развития опухоли. Торможение роста опухоли вычисляли по формуле: $TPO, \% = (V_{\text{контроля}} - V_{\text{опыта}}) / V_{\text{контроля}} \times 100\%$, где V – средний объем опухоли у животных в соответствующей группе. Увеличение продолжительности жизни вычисляли по формуле: $УПЖ, \% = [(СПЖ \text{ опыта} - СПЖ \text{ контроля}) / СПЖ \text{ контроля}] \times 100\%$, где СПЖ – средняя продолжительность жизни, дни.

2.8.3. Модель злокачественной перевиваемой опухоли рака шейки матки РШМ-5 in vivo

В качестве экспериментальной модели злокачественного роста была использована модель рака шейки матки РШМ-5, штаммы опухолевых клеток получены из банка глубоководно замороженных клеточных культур НИИ ЭДиТО РОНЦ имени Н.Н. Блохина. Данный тип опухоли плоскоклеточный ороговевающий, метастазирует в лимфоузлы. Взвесь опухолевых клеток РШМ-5 имплантировали каждой из 60 самок мышей линии СВА п/к в область подмышечной впадины по 30 мг в 0,3 мл раствора Хэнкса на одну мышшь. Стандартная прививочная доза составляла не менее 3×10^6 клеток/мышшь. День подкожной прививки клеток опухолевого штамма считали нулевым днем развития опухоли. Исследуемые соединения вводили внутривентриально в течение 2-х недель со 2 по 15 дни развития РШМ-5 (рисунок 15). В качестве позитивного контроля и препарата для изучения совместного действия с производными 5-оксипиридина применяли доксорубина гидрохлорид (ЭБВЕ Фарма Гес.м.б.Х.Нфг.КГ, Австрия), его вводили однократно на 2-й день развития опухоли в переносимой дозе, 4 мг/кг в/б.

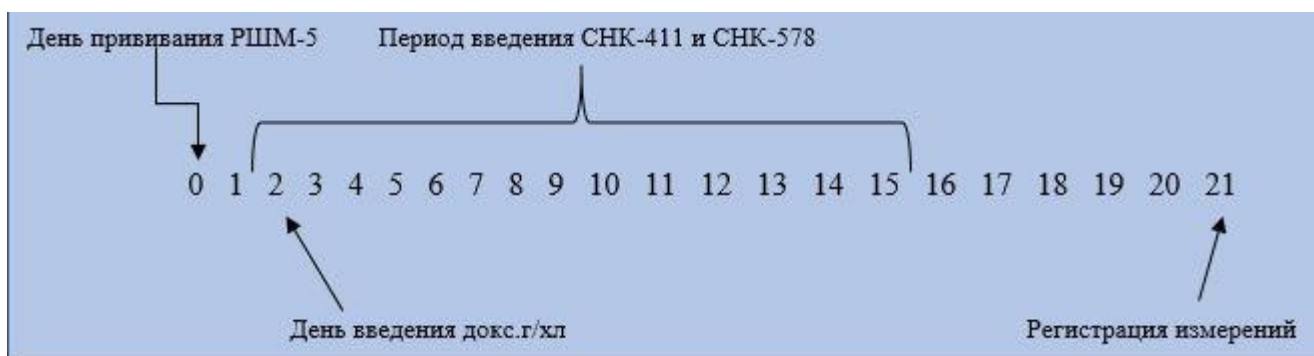


Рисунок 15. Дизайн исследования противоопухолевых свойств СНК-411 и СНК-578 на модели перевиваемого рака шейки матки РШМ-5 у мышей.

Животных рандомизировали в следующие группы:

Группа 1. Активный контроль: модель РШМ-5, 1% раствор крахмала, многократно, в/б, самки мышей линии СВА, n=10;

Группа 2. Модель РШМ-5 и СНК-578 в дозе 10 мг/кг, многократно, в/б, самки мышей линии СВА, n=10;

Группа 3. Модель РШМ-5 и СНК-411 в дозе 25 мг/кг, многократно, в/б, самки мышей линии СВА, n=10.

2.8.4. Оценка противоопухолевой активности в модели злокачественной перевиваемой опухоли рака шейки матки РШМ-5

Перевиваемая опухоль РШМ-5 является плоскоклеточной злокачественной опухолью, высота которой при диаметре 30 мм не всегда достигает 2 мм, в связи с чем, измерение ее объема дает необъективные результаты. На 7-е сутки после окончания двухнедельного введения исследуемых веществ (21-й день развития опухоли) животных выводили из эксперимента, из-

влекали опухоль и взвешивали на аналитических весах. Противоопухолевый эффект регистрировали по массе опухоли на момент выведения из эксперимента. Торможение роста опухоли (ТРО, %) вычисляли по формуле: $ТРО, \% = (M_{\text{контроля}} - M_{\text{опыта}}) / M_{\text{контроля}} \times 100\%$, где $M_{\text{контроля}}$ – среднее значение массы опухоли в контрольных группах, $M_{\text{опыта}}$ – среднее значение массы опухоли в группах, получавших препараты. Увеличение продолжительности жизни вычисляли по формуле:

$$\text{УПЖ, \%} = [(СПЖ_{\text{опыта}} - СПЖ_{\text{контроля}}) / СПЖ_{\text{контроля}}] * 100\%,$$

где СПЖ – средняя продолжительность жизни, дни.

2.8.5. Мультиплексное исследование цитокинов в сыворотке крови у животных-опухоленосителей в модели рака шейки матки РШМ-5 методом проточной цитометрии

Исследование концентрации цитокинов в сыворотке крови мышей-опухоленосителей проводили на проточном цитометре BD FACSCanto II по методу мультиплексного определения флуоресцентных частиц (LEGENDplex Custom Mouse 10-plex Panel, BioLegend, США) согласно протоколу производителя. Забор сыворотки у животных проводили путем декапитации на 21 день развития опухоли рака шейки матки РШМ-5, образцы хранили при -30°C до исследования концентраций цитокинов. Результаты обрабатывали в программе LEGENDplex v8.0 и выражали в пг/мл.

В основе анализа лежит принцип ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – микросферы с антителами к определенным цитокинам, различающиеся размерами и интенсивностью флуоресценции, добавляют к жидкости, содержащей исследуемые антигены, происходит взаимодействие [антиген-антитело]. Далее добавляются вторые антитела, связанные с биотином, которые в свою очередь взаимодействуют с аналитами. Полученный комплекс проявляется определенными флуорохромами. Концентрация конкретного аналита определяется при сравнении со стандартной калибровочной кривой, построенной в том же анализе.

Образцы инкубируются при $t=18-25^{\circ}\text{C}$ в темноте, два часа. Далее образцы отмывают рабочим буфером, добавляют флуорохромный конъюгат SA-PE (стрептавидин-фикоэритрин). Полученный комплекс связывается с биотином, обеспечивая флуоресцентный сигнал. В LEGENDplex существуют частицы (микросферы) двух типов: А (4,4 мкм) и В (5,5 мкм) – оба типа флуоросфер имеют по 5 вариантов интенсивности флуоресценции в определенной области спектра. Для возбуждения свечения флуоросфер использовалась линия спектра, испускаемая аргоновым лазером (488 нм).

2.8.6. Оценка антиметастатических свойств в модели перевиваемой опухоли LLC при удалении первичного опухолевого узла

Взвесь опухолевых клеток LLC имплантировали мышам-самцам линии C57BL/6 в подушечку правой стопы, прививочная доза составила 1×10^6 опухолевых клеток LLC.

На 14-й день после прививки опухолевых клеток, когда у всех мышей уже имеются метастазы, мышам в/б вводили тиопентал натрия в дозе 25 мг/кг, лапки с опухолью ампутировали по голеностопному суставу при наложении перетягивающего жгута, операционную рану обрабатывали медицинским клеем во всех группах, кроме контрольной группы 1 с неудаленной опухолью. Однократное введение доксорубина в дозе 4 мг/кг и курсовое введение производных 5-оксипириимидина начинали за 1 час до операции и продолжали в течение 8 дней (рисунок 16). Животных распределяли в следующие группы (по 15 животных в каждой группе):

1) группа активного контроля с первичным опухолевым узлом LLC / 1% раствор крахмала (контроль 1);

2) группа активного контроля с удаленным первичным опухолевым узлом (LLC) / 1% раствор крахмала (контроль 2);

3) LLC / однократное в/б введение доксорубина в дозе 4 мг/кг;

4) LLC / СНК-578 в течение 8-ми дней в/б в дозе 10 мг/кг;

5) LLC / СНК-411 в течение 8-ми дней в/б в дозе 25 мг/кг;

6) LLC / СНК-578 в течение 8 дней в/б в дозе 10 мг/кг + доксорубин однократно в/б в дозе 4 мг/кг;

7) LLC / СНК-411 в течение 8 дней в/б в дозе 25 мг/кг + доксорубин однократно в/б в дозе 4 мг/кг.



Рисунок 16. Дизайн исследования антиметастатических свойств СНК-411 и СНК-578 в модели перевиваемой эпидермоидной карциномы легкого Lewis на фоне удаления первичного опухолевого узла у мышей C57BL/6.

После курсового введения исследуемых соединений, часть животных выводили из эксперимента и подсчитывали количество метастазов в легких. При введении мышам в подушечку стопы 1×10^6 опухолевых клеток LLC на 14 сутки наблюдалась единичная гибель во всех группах, у всех животных в течение 8-ми суток подсчитывали число метастазов в легких. Эффективность лечебного воздействия определяли с помощью показателей:

- частота метастазирования (%);
- среднее количество метастазов в группе;

- величина различия в метастазировании опухоли между контрольной и опытной группами по индексу ингибирования метастазирования, %:

$$\text{ИИМ} = [(A_k \times B_k) - (A \times B)] / (A_k \times B_k) \times 100\% ,$$

где A_k и A – частота метастазирования в легкие у мышей контрольной группы и опытной; B_k и B – среднее число метастазов в легких на одно животное в контрольной и опытной группах.

На 22 день опыта оставили на выживание 7 животных в каждой группе, чтобы оценить эффективность терапии по увеличению средней продолжительности жизни (УПЖ). Увеличение продолжительности жизни вычисляли по формуле: УПЖ, % = [(СПЖ опыта – СПЖ контроля)/СПЖ контроля]*100%, где СПЖ – средняя продолжительность жизни, дни.

2.8.7. Мультиплексное исследование цитокинов в сыворотке крови у животных-опухоленосителей в модели эпидермоидной карциномы легкого Lewis на фоне удаления первичного опухолевого узла методом проточной цитометрии

Исследование концентрации цитокинов в сыворотке крови мышей-опухоленосителей на фоне удаления первичного опухолевого узла проводили на проточном цитометре BD FACSCanto II по методу мультиплексного определения флуоресцентных частиц (Mouse Th1/Th2 10plex Kit, eBioscience, Австрия) согласно протоколу производителя. Забор сыворотки у животных проводили путем декапитации на 22 день развития опухоли LLC, образцы хранили при -30°C до исследования концентраций цитокинов. Результаты обрабатывали в программе FlowCytoMix Pro 2.2.1 и выражали в пг/мл.

В основе анализа лежит принцип ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – микросферы с антителами к определенным цитокинам, различающиеся размерами и интенсивностью флуоресценции, добавляют к жидкости, содержащей исследуемые антигены, происходит взаимодействие [антиген-антитело]. Далее добавляются вторые антитела, связанные с биотином, которые в свою очередь взаимодействуют с аналитами. Полученный комплекс проявляется определенными флуорохромами. Концентрация конкретного аналита определяется при сравнении со стандартной калибровочной кривой, построенной в том же анализе.

Процедура определения содержания цитокинов в сыворотке крови включает этапы:

1. Перед использованием все реагенты нагревают до комнатной температуры (25°C).
2. В каждую ячейку плашки вносят по 25 μl буфера, в ячейки стандарта вносят по 25 μl стандарта, в ячейки экспериментальных групп вносят по 25 μl изучаемого образца.
3. Частицы встряхивают на вортексе в течение 30 секунд. В каждую ячейку плашки вносят по 25 μl частиц.
4. Добавляют по 50 μl биотинилированных антител во все ячейки.

5. Плашку закрывают с помощью наклейки и полностью покрывают её алюминиевой фольгой для защиты от попадания света. Затем плашку ставят на шейкер на 2 часа со скоростью 500 оборотов в минуту при комнатной температуре.
6. Плашку центрифугируют при скорости 1050 оборотов в минуту в течение 5 минут.
7. Сразу после центрифугирования, супернатант сливают быстрым движением (резко поворачивая плашку вверх дном и встряхивая её одним непрерывным и сильным движением).
8. Вносят 100 μ l буфера в каждую ячейку.
9. Добавляют 50 μ l SA-PE (стрептавидин-фикоэритрин) в каждую ячейку.
10. Закрывают плашку с помощью новой наклейки, покрывают всю плашку алюминиевой фольгой. Ставят на шейкер на 1 час со скоростью 500 оборотов в минуту при комнатной температуре.
11. Плашку центрифугируют при скорости 1050 оборотов в минуту в течение 5 минут.
12. Сразу после центрифугирования, супернатант сливают быстрым движением (резко поворачивая плашку вверх дном и встряхивая её одним непрерывным и сильным движением).
13. Вносят 200 μ l буфера в каждую ячейку.
14. Переносят содержимое ячеек в пробирки для цитометрии, добавляют 300 μ l буфера в каждую пробирку.
15. Регистрируют результаты на проточном цитометре.
16. Обрабатывают данные, полученные на цитометре, в ПО, предоставленном производителем.

В Mouse Th1/Th2 10plex Kit существуют частицы (микросферы) двух типов: А (4,4 мкм) и В (5,5 мкм) – оба типа флуоросфер имеют по 5 вариантов интенсивности флуоресценции в определенной области спектра. Для возбуждения свечения флуоросфер использовалась линия спектра, испускаемая аргоновым лазером (488 нм).

2.9. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы Statistica 10. Все регистрируемые характеристики животных представлены в таблицах в виде среднего и стандартной ошибки среднего ($\text{Mean} \pm \text{SEM}$) или медианы и первого и четвертого квартилей (Me (Q1; Q4)).

Проверка на нормальность распределения проводилась с применением общепринятых методов (критерий Шапиро-Уилка, критерий Колмогорова-Смирнова). Для проверки гипотезы об однородности групп исследования с нормальным распределением в исследуемой популяции

проводили тестирование отсутствия различий между группами при помощи t-критерия Стьюдента. В случае не Гауссовского распределения для сравнения показателей использовались непараметрические критерии Манна-Уитни, Вилкоксона, дисперсионный непараметрический критерий Краскела-Уоллиса. Результаты считались статистически значимыми, если значение P для теста было меньшим или равным 0,05.

Оценку гомогенности дисперсий проводили по Levene's test. Значимость влияния факторов при гомогенной дисперсии определялась с помощью дисперсионного анализа ANOVA, методом множественных сравнений по Newman-Keuls и Dunnett.

Для анализа выживаемости использовался метод множительных оценок Kaplan-Meier, для оценки достоверности различий между кривыми выживаемости использовался Cox's F-test. При сравнении частотных показателей применяли точный критерий Фишера.

Глава 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Оценка иммунофармакологических свойств производных 5-оксипиримидина СНК-411 и СНК-578

3.1.1. Исследование гуморального иммунного ответа в реакции пассивной гемагглютинации на тимусзависимый антиген (эритроциты барана)

Введение иммунодепрессанта доксорубицина в дозе 4 мг/кг мышам линии СВА значимо подавляло антителообразование на 19,7%, совместное введение СНК-578 в дозе 10 мг/кг и доксорубицина в дозе 4 мг/кг мышам линии СВА значимо подавляло антителообразование на 31%, усиливая иммунодепрессивные свойства доксорубицина (таблица 2, рисунок 17). Введение СНК-578 в дозе 10 мг/кг и доксорубицина в дозе 4 мг/кг мышам линии С57В1/6 также достоверно подавляло антителообразование на 26,5% (рисунок 18). Обработка сыворотки 0,2 М раствором 2-меркаптоэтанола приводило к разрушению антител с константой седиментации 19S, а именно иммуноглобулина IgM, оставляя в сыворотке IgG с константой седиментации 7S. У мышей линии С57В1/6 совместное введение СНК-578 и доксорубицина подавляло синтез IgM в 1,5 раза, а синтез IgG у мышей линии СВА снизился в 2,5 раза.

Таблица 2.

Влияние соединений на гуморальный иммунный ответ в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) на тимусзависимый антиген (эритроциты барана)

Группа, n=10	Величина гуморального иммунного ответа в тесте РПГА (средний \log_2 обратной величины титра антител), (Mean±SEM)		Величина гуморального иммунного ответа в тесте РПГА (средний \log_2 обратной величины титра антител), (Mean±SEM) Ig M		Величина гуморального иммунного ответа в тесте РПГА (средний \log_2 обратной величины титра антител), (Mean±SEM) Ig G	
	С57В1/6	СВА	С57В1/6	СВА	С57В1/6	СВА
Линии мышей						
Контроль (вода для инъекций)	6,8±0,5	7,1±0,3	5,9±0,5	4,3±0,6	0,9±0,2	2,8±0,5
СНК-578 10 мг/кг	7,3±0,3	7,2±0,5	5,1±0,3	3,9±0,6	2,2±0,3*	3,3±0,6
СНК-578 25 мг/кг	7,3±0,4	7,1±0,4	6,2±0,3	3,2±0,7	1,1±0,3	3,9±0,6
СНК-578 10 мг/кг+ доксорубицин 4 мг/кг	5,0±0,6*	4,9±0,7*	3,9±0,6*	3,6±0,8	1,1±0,5	1,1±0,7*
Доксорубицин 4 мг/кг	5,5±0,6	5,7±0,5*	5,0±0,7	3,0±0,7	0,4±0,5	3,0±0,5
Примечание: *- p < 0,05-достоверность различий по сравнению с контрольной группой по t-критерию Стьюдента, n - количество животных в группе.						

В ранее проведенных исследованиях [38] было обнаружено увеличение антителообразования на 12-25% под влиянием соединения СНК-411 в дозе 25 и 50 мг/кг.

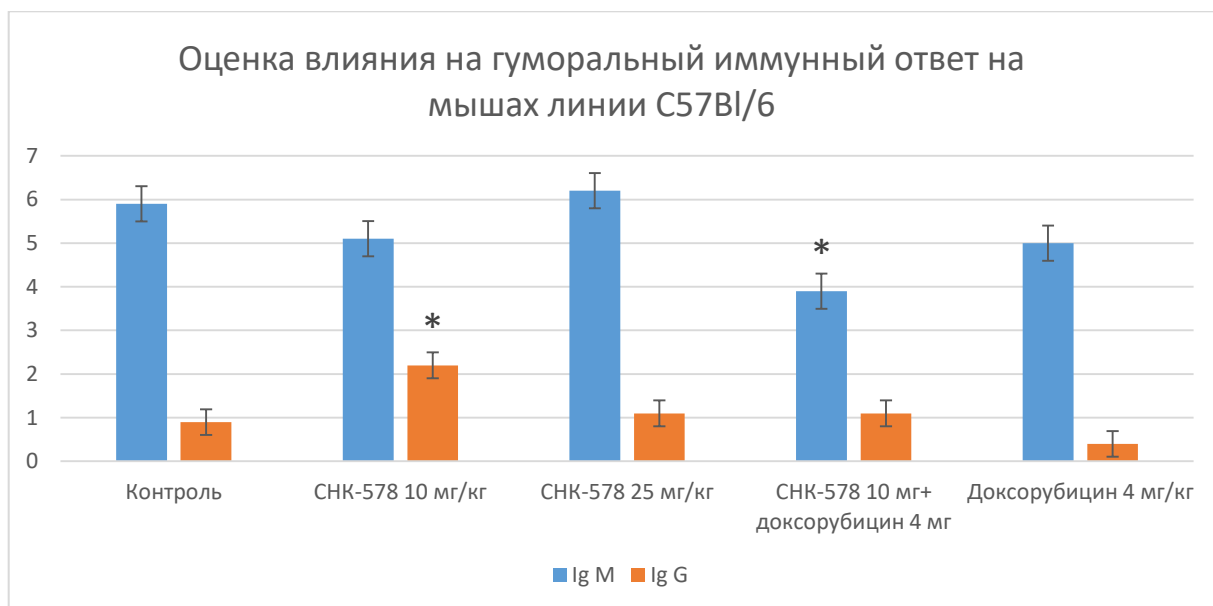


Рисунок 17. Влияние СНК-578 и его комбинации с доксорубицином на гуморальный иммунный ответ у мышей линии C57Bl/6. Примечание: *- $p < 0,05$ -достоверность различий по сравнению с контрольной группой по t-критерию Стьюдента

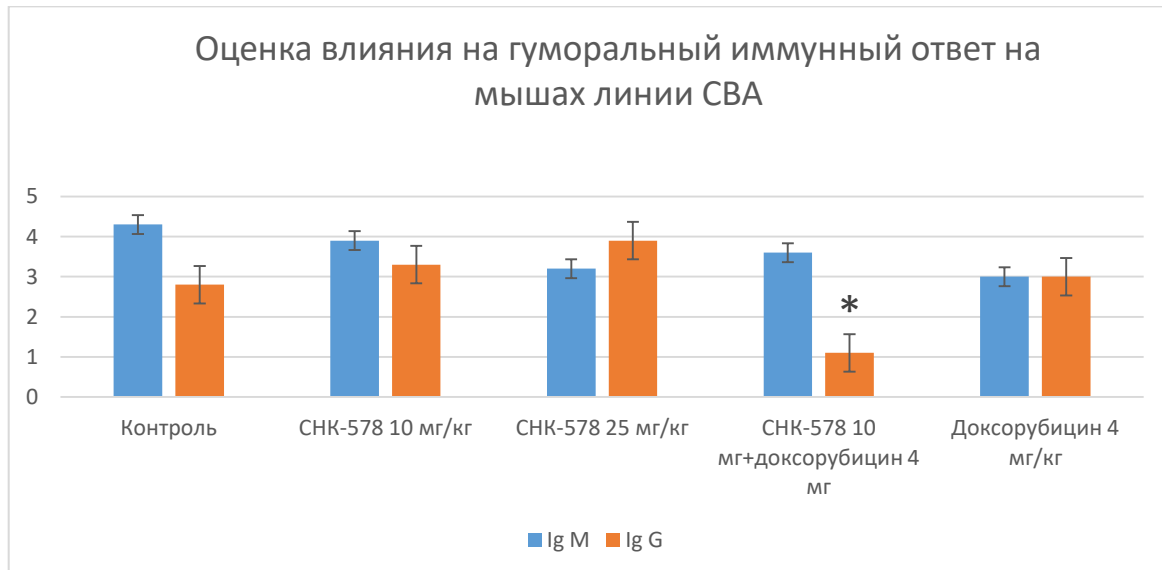


Рисунок 18. Влияние СНК-578 и его комбинации с доксорубицином на гуморальный иммунный ответ у мышей линии СВА. Примечание: *- $p < 0,05$ -достоверность различий по сравнению с контрольной группой по t-критерию Стьюдента

Таким образом, СНК-578 не вызывал активацию гуморального иммунного ответа на ЭБ. Комбинация СНК-578 (10 мг/кг, в/б, 3-кратно) с доксорубицином (4 мг/кг, в/б, однократно) достоверно подавляла Th2 гуморальный ответ у мышей линий СВА и C57Bl/6.

3.1.2. Исследование клеточного иммунного ответа в реакции гиперчувствительности замедленного типа

В ранее проведенных исследованиях [38] было обнаружено, что соединение СНК-411 в дозах 25 и 50 мг/кг вызывает значимое увеличение индекса реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) в 1,2 раза по сравнению с контрольной группой.

Согласно полученным данным (таблица 3), величина клеточного иммунного ответа значительно повысилась на 30,3% у животных, получавших СНК-578 в дозе 10 мг/кг, по сравнению с контрольной группой. Введение СНК-578 в дозе 25 мг/кг не стимулировало клеточный иммунный ответ.

Таблица 3.

Влияние соединений на клеточный иммунный ответ в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)

Группа, n=10	Величина клеточного иммунного ответа в реакции ГЗТ (Mean±SEM)
Контроль	42,6±2,1
СНК-578 10 мг/кг	55,5±5,4*
СНК-578 25 мг/кг	45,5±2,6
СНК-578, 10 мг/кг+ доксорубицин, 4 мг/кг	45,4±4,1
Доксорубицин, 4 мг/кг	46,6±3,2

Примечание: n - количество животных в группе; *- p <0,05-достоверность различий по сравнению с контрольной группой по t-критерию Стьюдента

3.1.3. Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов

В ранее проведенных исследованиях [38] функциональной активности перитонеальных макрофагов было обнаружено, что соединение СНК-411 в дозе 50 мг/кг значимо увеличивало фагоцитарный индекс в 1,2 раза по сравнению с контрольной группой.

В результате оценки фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов (таблица 4), было обнаружено, что введение СНК-578 в дозах 10 мг/кг, 25 мг/кг; комбинации СНК-578 в дозе 10 мг/кг с доксорубицином в дозе 4 мг/кг однократно; доксорубицина в дозе 4 мг/кг однократно не приводило к значимому изменению фагоцитарного индекса.

Таблица 4.

Влияние соединений на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов

Группа, n=10	ФИ (усл.ед.) (Mean±SEM)	Уровень значимости
Контроль	0,65±0,20	-
Доксорубицин, 4 мг/кг	0,42±0,13	p>0,05
СНК-578, 10 мг/кг	0,40±0,05	p>0,05
СНК-578, 10 мг/кг + доксорубицин, 4 мг/кг	0,33±0,11	p>0,05
СНК-578, 25 мг/кг	0,36±0,13	p>0,05

Примечание: n - количество животных в группе.

3.1.4. Определение массы и концентрации ядросодержащих клеток органов иммунной системы

При определении массы и клеточности органов иммунной системы после трехдневного в/б введения СНК-578, доксорубицина и комбинаций СНК-578 с доксорубицином было показано, что клеточность селезенки значительно уменьшилась на 29% в группе мышей, получавших СНК-578 в дозе 10 мг/кг, и на 36,3% в под действием СНК-578 в дозе 25 мг/кг по сравнению с контрольной группой (таблица 5, 6). Клеточность тимуса так же достоверно уменьшилась на 49,9% в опытной группе, получавшей СНК-578 в дозе 25 мг/кг, и на 49,7% у животных, которым вводили комбинацию СНК-578 в дозе 10 мг/кг и доксорубицина в дозе 4 мг/кг, по сравнению с данными контрольной группы. Масса тимуса значительно снизилась на 20,4% под влиянием комбинации СНК-578 в дозе 10 мг/кг (трехкратно, в/б) и доксорубицина в дозе 4 мг/кг (однократно в/б) по сравнению с данными группы контроля. Полученные результаты указывают на возможное достаточно выраженное цитостатическое действие соединения СНК-578, что необходимо подтвердить в дальнейших исследованиях.

Таблица 5.

Влияние соединений на массу лимфоидных органов (% от массы тела)

Группа, n=10	Селезенка (Mean±SEM)	Тимус (Mean±SEM)	Подколенные узлы (Mean±SEM)
Контроль	0,33±0,01	0,29±0,01	0,019±0,002
СНК-578 10 мг/кг	0,42±0,03*	0,29±0,03	0,021±0,003
СНК-578 25 мг/кг	0,36±0,02	0,26±0,02	0,027±0,004
Доксорубицин, 4 мг/кг	0,37±0,03	0,29±0,02	0,019±0,003
СНК-578, 10 мг/кг+ доксорубицин, 4 мг/кг	0,3±0,01*	0,20±0,02*	0,027±0,004

Примечание: * - $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни; n - количество животных в группе.

Таблица 6.

Влияние СНК-578 и его комбинации с доксорубицином на клеточность органов иммунной системы

Группа, n=10	Индекс клеточности = $\frac{n * 10^6 \text{ клеток}}{\text{мл} * \rho_{\text{органа}}}$, (Mean±SEM)		
	Индекс клеточности селезенки, 10^6	Индекс клеточности тимуса, 10^6	Индекс клеточности лимфоузлов, 10^5
Контроль	63,77±6,78	96,41±7,60	53,95±11,06
СНК-578, 10 мг/кг	38,35±3,53*	81,41±9,36	41,75±9,91
СНК-578, 25 мг/кг	39,35±7,29*	57,81±4,84*	25,7±7,47
Доксорубицин, 4 мг/кг	49,96±10,73	58,66±7,53*	26,5±5,70*
СНК-578, 10 мг/кг+ доксорубицин, 4 мг/кг	60,70±7,00	60,39±7,30*	34,09±11,13

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой по критерию Манна-Уитни, n - количество животных в группе.

В ранее проведенном МТТ-тесте [39] цитотоксического влияния СНК-411 на рост клеток К-562 было обнаружено, что соединение в концентрации 10^{-4} и 10^{-5} уменьшало долю жизнеспособных клеток на 36,0% и 18,1%, соответственно.

3.1.5. Оценка генерации активных форм кислорода методом люминол-зависимой клеточной хемилюминесценции

В ранее проведенных исследованиях [37] было показано, что введение соединения СНК-411 в дозах 25 и 50 мг/кг не приводило к значимому изменению показателей хемилюминесцентного ответа нейтрофилов на опсонизированный зимозан.

В результате оценки генерации активных форм кислорода, было показано, что введение СНК-578 в дозе 10 мг/кг и 25 мг/кг не приводило к значимому изменению показателей хемилюминесцентного ответа нейтрофилов на опсонизированный зимозан по сравнению с данными контрольной группы (таблица 7).

Таблица 7.

Влияние соединений на хемолюминесцентный ответ нейтрофилов на зимозан

Группа, n=10	ΔI , (mv) (Mean \pm SEM)	S, (ед)* 10^4 (Mean \pm SEM)	I макс (Mean \pm SEM)	I сп (Mean \pm SEM)
Контроль	146,4 \pm 40,4	13,9 \pm 5,0	155,4 \pm 52,2	9,0 \pm 1,4
Доксорубин 4 мг/кг	29,1 \pm 9,6	2,7 \pm 0,9	40,0 \pm 10,8	10,8 \pm 1,8
СНК-578, 10 мг/кг	126,9 \pm 30,1	12,1 \pm 5,1	138,8 \pm 49,2	11,9 \pm 4,6
СНК-578, 10 мг/кг + доксорубин, 4 мг/кг	88,0 \pm 39,9	8,8 \pm 3,7	96,7 \pm 40,4	8,7 \pm 1,4
СНК-578, 25 мг/кг	82,5 \pm 28,9	6,9 \pm 2,2	97,3 \pm 27,8	14,7 \pm 2,9
СНК-411, 25 мг/кг	289,1 \pm 85,6	2,1 \pm 0,6	365,4 \pm 92,5	76,3 \pm 12,5
СНК-411, 50 мг/кг	332,3 \pm 69,8	3,1 \pm 0,7	424,2 \pm 89,5	91,9 \pm 21,6

Примечание: n - количество животных в группе. ΔI – показатель уровня активированной хемолюминесценции, S – интегральный показатель хемолюминесценции, I сп – спонтанный уровень хемолюминесценции, I макс – максимальная величина хемолюминесценции после стимула.

3.2. Оценка противовоспалительной и противоаллергенной активности соединений СНК-411 и СНК-578

3.2.1. Острый экссудативный отек на каррагенан у крыс

При изучении противовоспалительной активности СНК-411 при однократном в/б введении в дозах 10 мг/кг, 25 мг/кг и 50 мг/кг показал выраженную противовоспалительную активность на модели экссудативного отека на каррагенан у крыс [37], сопоставимую с диклофенаком.

Согласно полученным данным (таблица 8, рисунок 19), у крыс контрольной группы пик развития местной воспалительной реакции наблюдался на 3 час эксперимента. Введение соединения СНК-578 в дозе 10 мг/кг выражено ($p < 0,01$) подавляло воспалительную реакцию у крыс по сравнению с контрольной группой в 2,4-3,5 раза на протяжении всего опыта, при этом, максимальная выраженность эффекта наблюдалась на пятый час регистрации отёка лапы. Введение

СНК-578 в дозе 10 мг/кг значимо подавляло реакцию воспаления на каррагенан по сравнению с диклофенаком, введенным в той же дозе, на 2 и 5 час опыта.

Таблица 8.

Изучение противовоспалительной активности СНК-578, СНК-411 и его комбинации с доксорубицином на модели острого экссудативного отека на каррагенан у аутбредных крыс (индекс реакции)

Время, n=10	Контроль (Mean±SEM)	Диклофенак 10 мг/кг (Mean±SEM)	СНК-578, 10 мг/кг (Mean±SEM)	СНК-411, 25 мг/кг + доксорубицин 4 мг/кг (Mean±SEM)	СНК-578, 10 мг/кг + доксорубицин 5 мг/кг (Mean±SEM)	Доксорубицин, 4 мг/кг (Mean±SEM)	Доксорубицин, 5 мг/кг (Mean±SEM)
1 час опыта	79,3±7,3	39±5,9*	23,3±5,6*	35,1±8,3*	27,8±8,1*	66,8±6,0	73,4±7,5
2 час опыта	105,7±7,5	60,4±7,5*	35,5±4,7*#	66,6±9,2*	49,2±6,5*	81,8±5,1*	97,2±6,3
3 час опыта	115,2±10,4	66,2±8,0*	43,4±5,2*	68,5±9,2*	65,3±9,8*	95,8±4,9	104,2±5,9
4 час опыта	88,4±11,3	50,6±3,8*	36,9±3,7*	60,2±4,9*	54,0±5,8*	58,7±6,7**	80,9±7,7
5 час опыта	78,9±8,9	45,0±4,7*	22,5±4,7*#	54,2±4,2**	48,0±7,7*	29,2±3,6*	48,4±6,7*

Примечание: *- p < 0,01 по критерию Манна-Уитни по сравнению с группой контроля, **-p<0,05 по критерию Манна-Уитни по сравнению с группой контроля, # - p<0,05 по критерию Манна-Уитни по сравнению с группой диклофенака, n - количество животных в группе.

Введение комбинации соединений СНК-578 в дозе 10 мг/кг и доксорубицина в дозе 4 мг/кг приводило к значимому подавлению отека в 2,9 раза, 2,1 раза, 1,8 раз, 1,6 и 1,6 раз с первого по пятый час опыта, соответственно. Диклофенак в дозе 10 мг/кг значимо подавлял экссудативный отек в 2 раза в первый час опыта, в 1,7 раз в остальные часы эксперимента.

У животных, получавших комбинацию соединений СНК-411 в дозе 25 мг/кг и доксорубицина в дозе 4 мг/кг, каррагенан-индуцированный отек был значимо подавлен в течение всего опыта: в 2,3 раза на первый час опыта, в 1,7 раз на второй и третий час, в 1,5 раза на четвертый и пятый часы эксперимента по сравнению с контрольной группой.

Полученные данные на модели острого экссудативного отека на каррагенан подтвердили наличие выраженной противовоспалительной активности у производных 5-оксипиридина, ранее выявленной на модели реакции воспаления на конканавалин А в опытах на мышах. Индекс реакции воспаления в группе СНК-578 в дозе 10 мг/кг значимо ниже по сравнению с группой диклофенака. Совместное применение СНК-411 и СНК-578 с доксорубицином также оказывало противовоспалительное действие.

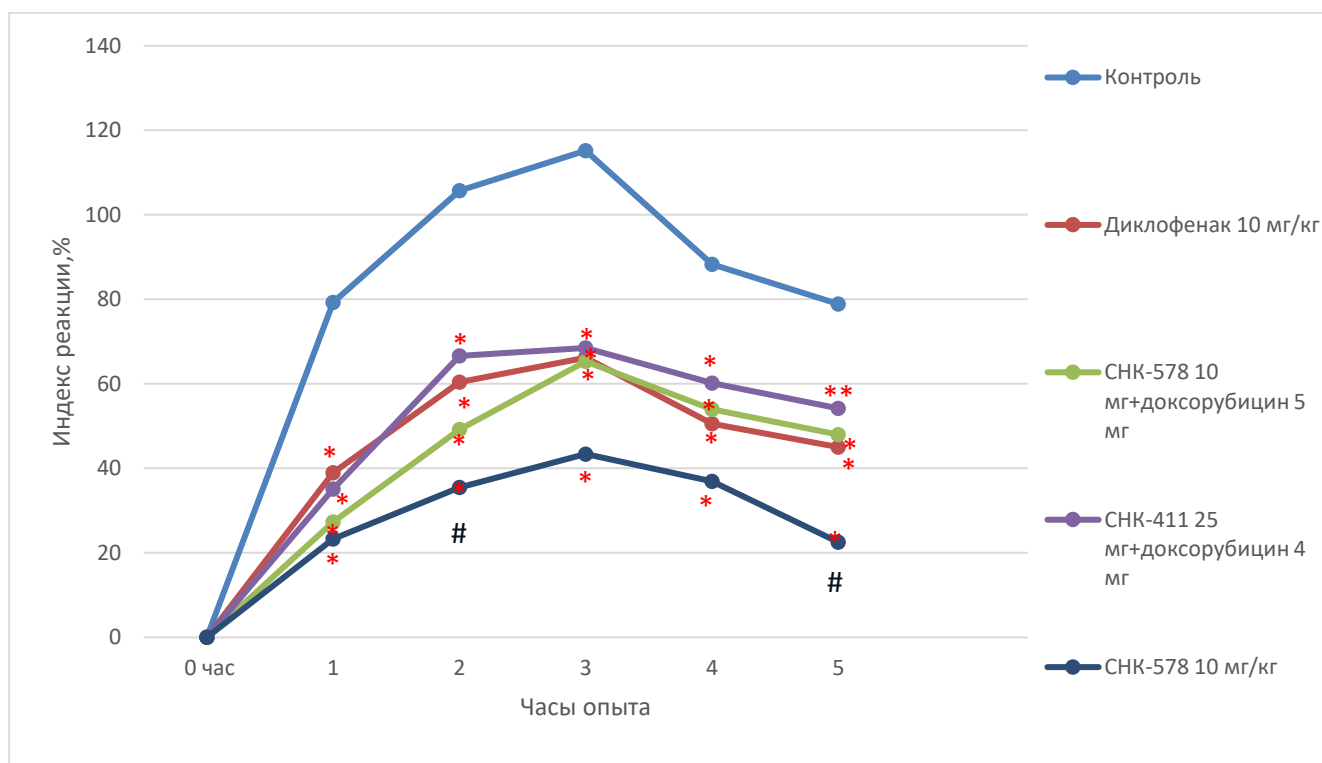


Рисунок 19. Противовоспалительная активность СНК-411, СНК-578 и их комбинаций с доксорубицином на модели экссудативного отека на каррагенан у крыс. Примечание: *- $p < 0,01$ по критерию Манна-Уитни по сравнению с группой контроля; **- $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни по сравнению с группой контроля; #- $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни по сравнению с группой диклофенака

Таким образом, результаты проведенного исследования указывают на возможное подавление ЦОГ-2, что необходимо исследовать в дальнейшем для понимания механизма противовоспалительной активности 5-оксипиримидина.

3.2.2. Реакция воспаления на конканавалин А

Согласно результатам ранее проведенных исследований СНК-411 на модели острого экссудативного воспаления на КонА [37] продемонстрировал выраженные противовоспалительные свойства в дозах 25 мг/кг, 50 мг/кг и 100 мг/кг per os, сопоставимые с действием референтного препарата диклофенака в дозе 10 мг/кг, снижая индекс реакции в 1,5-2,3 раза.

Результаты изучения противовоспалительных свойств СНК-411 и СНК-578 в сравнении с диклофенаком представлены в таблице 9. В первой серии опытов диклофенак подавлял реакцию воспаления на КонА на 37%, во второй – на 44%. Однократное внутрибрюшинное введение СНК-411 в дозе 10 мг/кг приводило к подавлению реакции воспаления на КонА на 51%, аналогичное введение СНК-578 в дозе 10 мг/кг – на 72%. Введение СНК-411 и СНК-578 в дозе 25 мг/кг также подтвердило противовоспалительную активность соединений в виде значимого подавления реакции на 66,3% и на 62%, соответственно, а в дозе 50 мг/кг – на 46,6 и 63%.

Таблица 9.

Влияние производных 5-оксипиримидина СНК-411, СНК-578 на индекс реакции воспаления на конканавалин А у мышей линии СВА

1-я серия опытов		2-я серия опытов	
Группа, n=10	Индекс реакции воспаления на КонА (Mean±SEM)	Группа, n=10	Индекс реакции воспаления на КонА (Mean±SEM)
Контроль (физ. р-р)	17,8±2,1	Контроль (физ. р-р)	16,3±1,8
Диклофенак, 10 мг/кг	11,2±1,1*	Диклофенак, 10 мг/кг	9,1±1,3**
СНК-411, 10 мг/кг	8,7±2,1**	СНК-578, 10 мг/кг	4,6±2,0**#
СНК-411, 25 мг/кг	6,0±2,3**	СНК-578, 25 мг/кг	6,2±2,5**
СНК-411, 50 мг/кг	9,5±2,3*	СНК-578, 50 мг/кг	6,0±1,8**

Примечание: n – количество животных в каждой группе;
 * - p<0,05 по сравнению с контрольной группой по t-критерию Стьюдента; ** - p<0,01 по сравнению с контрольной группой по t-критерию Стьюдента; # - p<0,05 по сравнению с диклофенаком по t-критерию Стьюдента.

Таким образом, производные 5-оксипиримидина СНК-411 и СНК-578 в диапазоне доз 10-50 мг/кг при внутрибрюшинном введении обладают выраженной противовоспалительной активностью в опытах на мышах линии СВА в реакции воспаления на КонА. Индекс реакции воспаления в группе СНК-578 в дозе 10 мг/кг значимо ниже по сравнению с группой диклофенака.

3.2.3. Изучение противоаллергенной активности соединений методом реакции общей анафилаксии на овальбумин в опытах на морских свинках альбиносах

При изучении противоаллергенной активности в первой серии опытов, при иммунизации свинок 1% БКЯ (таблица 10), в контрольной группе у всех 8 морских свинок наблюдали тяжелую реакцию системной анафилаксии, которая закончилась быстрой гибелью всех животных, индекс реакции по Weigle составил 4,0. При внутрибрюшинном введении на 16 день опыта супрастина или СНК- 411 в дозе 50 мг/кг, затем через 1 час при внутрисердечном введении разрешающей дозы аллергена (1% раствора БКЯ) у 3 из 8 животных, которым в течение опыта вводили супрастин, и у 2 из 8 животных, которым вводили СНК-411, реакция анафилаксии на введение овальбумина отсутствовала. У остальных животных наблюдали анафилактическую реакцию различной степени тяжести, индекс реакции по Weigle в группе животных, которым вводили супрастин, составил 1,1, в группе СНК-411- 2,25.

Во второй серии опытов при иммунизации 0,6% раствором БКЯ у всех животных контрольной группы развивалась реакция анафилаксии различной степени тяжести в ответ на

внутрисердечное введение разрешающей дозы овальбумина. Индекс реакции в контрольной группе по Weigle составил 2,5. При введении СНК-578 в дозе 25 мг/кг в течение опыта индекс по Weigle составил 0,9. При введении СНК-578 в дозе 50 мг/кг индекс реакции по Weigle составил 0,25. Супрастин в дозе 50 мг/кг вызвал сопоставимую с СНК-578 в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг достоверную противоаллергенную активность, индекс реакции по Weigle составил 0,6. Таким образом, при иммунизации 1% раствором БКЯ, вызывающей 100% гибель в контрольной группе, 4-х кратное внутрибрюшинное введение СНК-411 в дозе 50 мг/кг в 1,8 раза уменьшает индекс анафилактической реакции по Weigle на овальбумин ($p < 0,05$). При иммунизации животных 0,6% раствором БКЯ, СНК-578 в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг в 2,8 и в 10 раз снижает индекс анафилактической реакции при $p < 0,05$.

Таблица 10.

Противоаллергенные свойства СНК-411 и СНК-578 на модели системной анафилаксии на овальбумин у морских свинок

Группа, n=8	Индекс реакции по Weigle	0	+	++	+++	++++
		(отсутствие реакции)	(слабый шок)	(умеренный шок)	(тяжелый шок)	(гибель)
		Число животных с различной степенью реакции анафилаксии				
Контроль БКЯ 1%	4,0	-	-	-	-	8
Супрастин 50 мг/кг	1,1*	3	2	2	1	-
СНК-411 50 мг/кг	2,25*	2	2	-	-	4
Контроль БКЯ 0,6%	2,5	-	3	1	1	3
Супрастин 50 мг/кг	0,6*	5	1	2	-	-
СНК-578 25 мг/кг	0,9*	5	1	1	-	1
СНК-578 50 мг/кг	0,25*	6	2	-	-	-

Примечание: n – количество животных в каждой группе; * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой по критерию Манна-Уитни, ** - $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой по критерию Манна-Уитни

Таким образом, полученные данные указывают на наличие антиаллергической активности у СНК-411 и СНК-578. СНК-578 в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг обладает противоаллергенным действием, сопоставимым с препаратом сравнения супрастином.

Полученные результаты опубликованы в работах с соавторами: [32].

3.3. Оценка противоопухолевой и антиметастатической активности соединений СНК-411 и СНК-578

3.3.1. Оценка противоопухолевой активности соединений в модели злокачественной перерываемой эпидермоидной карциномы легкого Lewis (LLC)

Согласно данным Кузнецовой О.С., доксорубин значимо подавлял рост опухоли LLC на 45,3% на 9 день, на 30,2% – на 16 день развития опухоли, соответственно [37]. Для выявле-

ния потенциального антиметастатического действия СНК-411 и доксорубицина¹ было изучено их влияние на процесс метастазирования: проведено морфологическое исследование легких в группе животных, получавших доксорубицин, на 21 сутки после инокуляции LLC. При 2-х кратном введении доксорубицина на 2 и 4 день после инокуляции опухоли LLC мышам линии C57BL/6 нами было зарегистрировано значимое (таблица 11) уменьшение количества и площади метастазов на стекле, морфометрический индекс метастазирования выявил значительное уменьшение площади метастазов по отношению к площади легких в группе животных, которым вводили доксорубицин, по сравнению с контрольной группой, и более выраженное, чем у СНК-411. Однако двухкратное через 48 часа введение доксорубицина г/хл в/б в дозе 4 мг/кг приводило к гибели 3 животных из 10, что указывает на его выраженную токсичность. По данным литературы LD₅₀ доксорубицина г/хл составляет 13-15 мг/кг, по другим данным [3] LD₅₀ при в/б введение доксорубина г/хл мышам составило 10,8 мг/кг. По нашим данным в опытах на аутбредных мышах самцах при в/б введении доксорубицина г/хл (доксорубицин ЭБЕВЕ Фарма Гес.м.б.Х.НФГ.КГ, Австрия) LD₅₀ также составило 10,8 мг/кг. Поэтому в наших дальнейших исследованиях мы вводили доксорубицин однократно в дозе 4 мг/кг в качестве препарата сравнения и при совместном введении с производными 5-оксипиридина.

Таблица 11.

Влияние СНК-411 и доксорубицина на морфометрические показатели метастатического поражения легких мышей с LLC

Группа, n=10	Площадь (S) метастазов на стекле (μм ²)	Площадь (S) легких на стекле (μм ²)	Индекс метастазирования (S метастазов/ S легких*1000)
Контроль, LLC	3 835 988 (3 482 802 – 4 196 708)	32 757 817 (25 211 227 – 36 973 140)	109 94 – 140
СНК-411 50 мг/кг, в/б	471 112* 101 803 – 571 876	18 236 922 16 001 281 – 21 457 862	29* 5 – 32
Доксорубицина г/хл., 4 мг/кг, в/б, LLC	442 327* (265 559 – 570 588)	3 6860 452 (24 590 141 – 38 986 289)	14* 5 – 26

Примечание: n=10 – количество животных в группах на 21 день эксперимента; * - p<0,05 - достоверность различий по сравнению с контрольной группой LLC по непараметрическому критерию Краскелла-Уоллиса с последующей обработкой методом множественных сравнений по Данну.

Ранее проведенные исследования также показали, что СНК-411 при внутрибрюшинном (в/б) введении в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг со 2-го по 8 дни развития перевиваемой эпидермоидной карциномой легкого Lewis (LLC) ингибирует рост опухоли соответственно в 1,8 и 2,2 раза

¹Исследование проведено совместно с ведущим научным сотрудником, кандидатом биологических наук А.В. Сорокиной.

на 9 день развития опухоли и увеличивает продолжительность жизни мышей с LLC, получавших соединение в тех же дозах со 2 по 8 и с 8 по 15 дни развития опухоли.

У мышей контрольной группы с LLC в настоящем исследовании объем опухоли на протяжении эксперимента увеличивался: на 7 сутки после окончания введения препаратов объем опухоли составил $4218,1 \pm 863,52$ мм³, на 14 сутки – $6909,4 \pm 1774,60$ мм³ (таблица 12).

На 7 сутки после окончания курсового введения СНК-578 в дозе 10 мг/кг подавление роста объема опухоли составляло 3,6 раза по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$): торможение роста опухоли (ТРО) равно 72,2%. На 14 сутки после окончания введения ТРО в этой группе соответствовало 51,1%, однако не достигало уровня значимости относительно значения контрольной группы. При этом у 2 из 10 мышей, которым вводили соединение СНК-578, опухоль не развивалась.

В отличие от СНК-578, соединение СНК-411 в дозе 25 мг/кг значимого действия на рост опухолевого узла через 7 и 14 дней после окончания его курсового введения не проявляло (ТРО составляло 41,7% и 35,0%, соответственно). После однократного в/б введения препарата сравнения доксорубин в дозе 4 мг/кг значения ТРО в эти же сроки развития опухоли соответствовали 31,6% и 34,2% ($p > 0,05$).

Таблица 12.

Влияние производных 5-оксипиримидина и их комбинаций с доксорубином на объем опухоли LLC, степень торможения роста опухоли и выживаемость у мышей линии C57Bl/6

Группа, доза, n=10	Показатели оценки противоопухолевого действия		Время регистрации результатов		
			через 7 дней после окончания введения	через 14 дней после окончания введения	
Активный контроль: модель LLC и 1 % раствор крахмала	Объем LLC, мг		4218,1±863,5	6909,4±1774,6	
	ТРО, %		-	-	
	СПЖ, дни		-	30,8±2,0	
	УПЖ, %		-	-	
	Харак-ки функций выживаемости	Нижний квартиль		-	27,0
		Медиана		-	28,0
Верхний квартиль		-	35,0		
Модель LLC и доксорубин, 4 мг/кг	Объем LLC, мг		2883,9±400,3	4549,8±347,9	
	ТРО, %		31,6	34,1	
	СПЖ, дни		-	32,3±2,2	
	УПЖ, %		-	4,87	
	Харак-ки функций выживаемости, дни	Нижний квартиль		-	26,0
		Медиана		-	31,0
Верхний квартиль		-	39,0		
Модель LLC и СНК-578, 10 мг/кг	Объем LLC, мг		1173,2±477,6#	3378,2±1023,7	
	ТРО, %		72,2#	51,1	
	СПЖ, дни		-	43,1±4,1	
	УПЖ, %		-	38,6*	
	Харак-ки функ-	Нижний квартиль	-	30,0	

	ций выживаемости	Медиана	-	43,0	
		Верхний квартиль	-	56,0	
Модель LLC и СНК-411, 25 мг/кг	Объем LLC, мг		2458,4±494,8	4488,4±850,9	
	ТРО, %		41,7	35,0	
	СПЖ, дни		-	37,4±3,3	
	УПЖ, %		-	20,5	
	Хар-ки функций выживаемости	Нижний квартиль		-	31,0
		Медиана		-	35,0
Верхний квартиль		-	43,0		
Модель LLC и СНК-578, 10 мг/кг в комбинации с доксорубицином, 4 мг/кг	Объем LLC, мг		2135,6±445,8	4357,2±873,1	
	ТРО, %		49,4	36,9	
	СПЖ, дни		-	36,8±3,3	
	УПЖ, %		-	18,5	
	Харак-ки функций выживаемости	Нижний квартиль		-	30,0
		Медиана		-	33,0
Верхний квартиль		-	42,0		
Модель LLC и СНК-411, 25 мг/кг в комбинации с доксорубицином, 4 мг/кг	Объем LLC, мг		1889,9±500,1#	4575,2±896,0	
	ТРО, %		55,2#	33,8	
	СПЖ, дни		-	35,3±3,1	
	УПЖ, %		-	14,6	
	Харак-ки функций выживаемости	Нижний квартиль		-	31,0
		Медиана		-	33,0
Верхний квартиль		-	40,0		
Примечание: n – количество животных, распределение в группах было ненормальным; # - p<0,05 по сравнению с контрольной группой, непараметрический аналог однофакторного дисперсионного анализа по Краскелу-Уоллису; * - p<0,05 по сравнению с контрольной группой по Cox's F-Test. . ТРО-торможение роста опухоли, СПЖ-средняя продолжительность жизни, УПЖ-увеличение продолжительности жизни.					

При сочетанном курсовом введении СНК-411 в дозе 25 мг/кг и однократном введении доксорубицина в дозе 4 мг/кг на 7 день после прекращения введения СНК-411 подавление роста опухоли составило 2,2 раза ($p<0,05$ по сравнению с контрольной группой), ТРО равно 55,2%. Комбинация СНК-578 в дозе 10 мг/кг и доксорубицина в дозе 4 мг/кг значимого действия на объем опухоли не оказывала (ТРО равно 49,4% и 36,9% на 7 день и 14 день, соответственно, $p>0,05$).

Анализ выживаемости мышей с LLC методом Kaplan-Meier представлен на рисунке 20. Значимое увеличение выживаемости по сравнению с контрольной группой выявлено в группе животных, которым вводили СНК-578 в дозе 10 мг/кг. Медиана продолжительности жизни мышей в этой группе составляла 43 дня; в контрольной группе медиана продолжительности жизни составила 28 дней. Увеличение продолжительности жизни мышей C57BL/6 с LLC, получавших СНК-578 в дозе 10 мг/кг, соответствовало 38,6% по сравнению с контрольной группой.

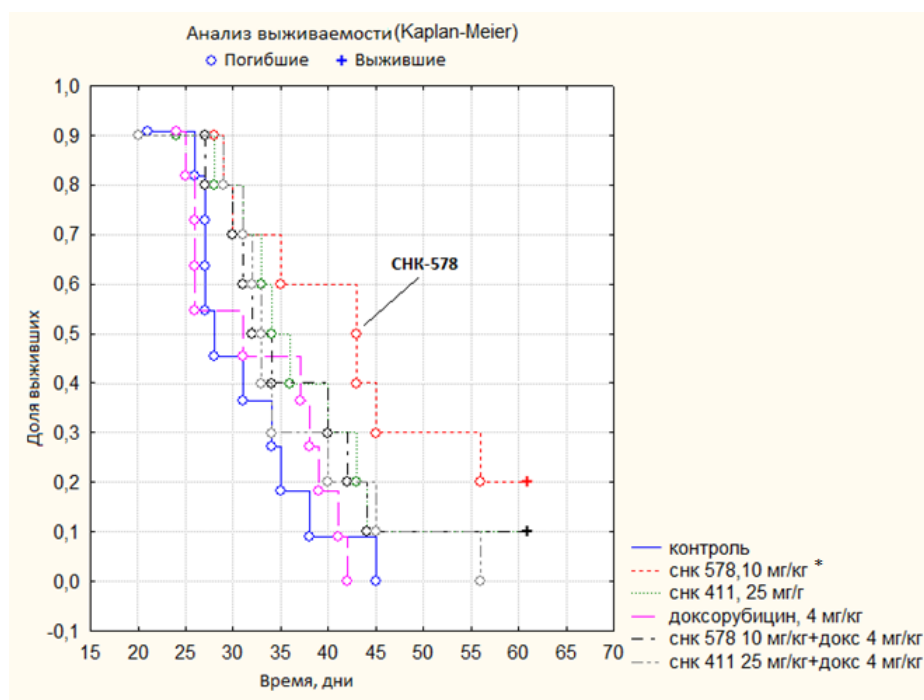


Рисунок 20. Оценка выживаемости мышей C57Bl/6 с перевиваемой LLC по методу множительных оценок Kaplan-Meier. Примечание: *- $p < 0,05$ по Cox's-F тесту по сравнению с группой контроля.

Таким образом, СНК-578 в дозе 10 мг/кг при 14-ти дневном в/б введении ингибирует рост опухоли и увеличивает продолжительность жизни мышей C57BL/6 с LLC. Снижение роста опухоли после курсового введения СНК-411 в дозе 25 мг/кг или однократного введения доксорубина в дозе 4 мг/кг не достигало уровня статистической значимости; при сочетанном курсовом введении СНК-411 и доксорубина зарегистрировано значимое снижение объёма опухоли на 7 день после окончания введения соединений, что свидетельствует об их аддитивном действии.

Полученные результаты опубликованы в работах с соавторами: [30; 34].

3.3.2. Оценка противоопухолевой активности соединений на модели злокачественной перевиваемой опухоли рака шейки матки РШМ-5

У мышей контрольной группы с РШМ-5 масса опухоли на 7 сутки после окончания введения препаратов (21 день развития опухоли) составила 1255,0 мг. В группе животных, которым вводили СНК-578 в дозе 10 мг/кг, определили выраженное подавление роста массы опухоли (168,5 мг) в 7,4 раза меньше по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$): торможение роста опухоли (ТРО) составило 86,6%. В группе животных, которым вводили соединение СНК-411 в дозе 25 мг/кг, средняя масса опухоли составила 718,5 мг. Таким образом, наблюдалось значимое подавление роста опухолевого узла на 42,7% (таблица 13).

Таблица 13.

Влияние производных 5-оксипириимидина и их комбинаций с доксорубицином на массу опухоли РШМ-5 и степень торможения роста опухоли у самок мышей линии СВА

Группы, дозы, n=10	Масса опухоли, мг (Median (Q1; Q4))	Степень торможения роста опухоли, ТРО%
Контроль с опухолью РШМ-5	1255,0 (928,0;1816,0)	-
СНК-411, 25 мг/кг	718,5 (252,0;903,0)*	42,7
СНК-578, 10 мг/кг	168,5 (0,0;281,0)*	86,6
Примечание: n - количество животных; * - p<0,05 по критерию Манна-Уитни по сравнению с группой "контроль с опухолью".		

Таким образом, СНК-578 в дозе 10 мг/кг при 14-ти дневном в/б введении выражено ингибирует рост опухоли у самок мышей СВА с РШМ-5. Снижение роста опухоли после курсового введения СНК-411 в дозе 25 мг/кг также достигало уровня статистической значимости $p<0,05$.

3.3.3. Мультиплексное исследование цитокинов в сыворотке крови у животных-опухоленосителей на модели рака шейки матки РШМ-5 методом проточной цитометрии

Влияние 14-ти дневного введения СНК-411 и СНК-578 на концентрацию цитокинов IL-2, IFN- γ , IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-4, IL-5, IL-10, IL-11, IL-13 в сыворотке крови самок мышей линии СВА с РШМ-5 проводили ² на проточном цитометре BD FACSCanto II методом мультиплексного определения флуоресцентных частиц (LEGENDplex Custom Mouse 10-plex Panel, BioLegend, США) согласно протоколу производителя. Результаты обрабатывали в программе LEGENDplex v8.0 и выражали в пг/мл. Данные по содержанию интерлейкинов IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-17A представлены в таблице 14, остальные цитокины в сыворотке крови мышей - опухоленосителей были обнаружены в единичных и незначительных количествах в каждой из опытных групп. Согласно данным литературы, экспериментальный рак шейки матки (РШМ-5) устойчив к действию большинства противоопухолевых средств, кроме аналогов пириимидина [269].

Через 7 дней после окончания введения препаратов концентрация цитокинов IL-6, IL-10, IL-17A значимо увеличилась у животных с имплантированной опухолью по сравнению с интактным контролем (таблица 14). Эти данные согласуются с литературными сведениями, указывающими, что у животных опухоленосителей повышается уровень данных цитокинов [46]. Концентрация цитокинов IL-6, IL-10, IL-17A у мышей с опухолью была выше против интактно-

² Исследование проведено совместно со старшим научным сотрудником лаборатории фармакологической генетики, кандидатом биологических наук Зайнуллиной Л.Ф.

го контроля на 229%, 40% и 62%, соответственно, на уровень Th1-цитокина IFN- γ производные 5-оксипиридина подавляющего действия не оказывали. На этом фоне высокоактивный СНК-578 подавлял содержание проонкогенных IL-10 и IL-17A и провоспалительного IL-6 на 61%, 70% и 29% по сравнению с активным контролем с опухолью, а СНК-411 подавлял IL-10 и IL-17A на 48% и 60% соответственно, но значимо не влиял на уровень IL-6. Дисрегулируемый непрерывный синтез IL-6 вовлечен в развитие различных заболеваний, включая аутоиммунные, хронические воспалительные заболевания и рак [239;246]. Учитывая роль IL-6 в аутоиммунном ответе организма, можно предположить участие иммунного контроля в развитии противоопухолевого эффекта СНК-578.

Таблица 14.

Исследование содержания цитокинов в сыворотке крови животных-опухоленосителей с РШМ-5 при введении СНК-411 и СНК-578

Группы, дозы, n=10	Цитокины, пг/мл (Median (Q1; Q4))			
	IL-6	IL-10	IL-17A	IFN- γ
Контроль без опухоли (интактный)	18,92 (12,24;27,12)	89,88 (67,12;103,76)	10,78 (7,24;11,92)	24,72 (19,36;34,12)
Контроль с опухолью РШМ-5 (активный)	62,38 (51,36;133,36)#	125,84 (103,16;134,12)#	17,54 (13,88;20,20)#	44,68 (27,92;84,28)
СНК-411, 25 мг/кг	58,48 (47,32;91,28)	65,76 (54,64;104,88)##	7,02 (5,00;8,52)##	41,24 (30,40;76,92)
СНК-578, 10 мг/кг	44,44 (15,88;78,76)##	48,40 (14,48;64,32)##	5,2 (3,36;6,44)##	36,06 (29,48;43,88)

Примечание: n - количество животных; # - $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля без опухоли, по тесту Ньюмана-Кейлса; ## - $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля с опухолью, по тесту Ньюмана-Кейлса. В/б введение соединений осуществлялось со 2 по 15 дни развития РШМ-5.

Таким образом, курсовое введение СНК-411 и СНК-578 значимо подавляет уровень проонкогенного Th2-цитокина IL-10 и Th17-цитокина IL-17A. Полученные данные согласуются с данными о торможении роста опухоли РШМ-5 у самок мышей линии СВА соединениями СНК-411, СНК-578. Согласно данным клинических исследований [44], при предраковом состоянии шейки матки, ее дисплазии, в сыворотке крови больных под воздействием плеiotропного цитокина IL-4 нарушается баланс Th1- и Th2-цитокинов с выраженным уменьшением IFN- γ , действующего на вирус папилломы человека, что в итоге и приводит к онкологии. В наших исследованиях [40] у самцов мышей линии C57BL/6 с LLC курсовое введение СНК-411 приводило к выраженному подавлению уровня IL-4 в сыворотке крови мышей, что коррелировало с торможением роста опухоли.

Полученные результаты опубликованы в работах с соавторами: [31].

3.3.4. Оценка антиметастатических свойств в модели перевиваемой эпидермоидной карциномы легкого Lewis (LLC) при удалении первичного опухолевого узла

Индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) в легких мышей C57Bl/6 (таблица 15) на 22-й день после перевивания животным LLC, удаления первичного опухолевого узла на 14 день опыта и затем 8-ми дневной в/б монотерапии СНК-578 в дозе 10 мг/кг и СНК-411 в дозе 25 мг/кг среднее количество метастазов в опытных группах было значимо ниже по сравнению с контрольной группой с неудаленной (контроль № 2, ИИМ-50,9%) и с удаленной опухолью (контроль №3, ИИМ-53,3%). При курсовом введении СНК-578 в дозе 10 мг/кг в сочетании с однократным введением доксорубина в дозе 4 мг/кг ИИМ составил 50%, количество метастазов в группе был достоверно ниже по сравнению с активным контролем 1 (с неудаленной опухолью).

Увеличение продолжительности жизни на 60,2% определили при в/б введении СНК-411 в дозе 25 мг/кг, при однократном введении доксорубина в дозе 4 мг/кг - на 53,9%. СНК-578 в дозе 10 мг/кг в сочетании с однократным введением доксорубина в дозе 4 мг/кг при 8-ми дневном введении увеличивал среднюю продолжительность жизни на 42,9%. На 60-й день опыта после инокуляции опухоли в подушечку медиана выживаемости в контрольных группах составляла 15 дней, при введении СНК-411 – 33 дня, доксорубина – 32 дня, СНК-578 и доксорубина - 30 дней, СНК-411 и доксорубина - 18 дней (рисунок 21).

Таблица 15.

Оценка антиметастатических свойств СНК-411 и СНК-578 на модели перевиваемой карциномы легкого Льюис при удалении первичного опухолевого узла

Группы; n=8	Контроль № 2 с неудаленной опухолью	Контроль № 3 с удаленной опухолью	СНК-411, 25 мг/кг в/б	СНК-578, 10 мг/кг в/б	DOX, 4 мг/кг в/б однократно	СНК-411, 25 мг/кг +DOX, 4 мг/кг	СНК-578, 10 мг/кг +DOX, 4 мг/кг
Частота метастазирования, %	100	100	100	100	100	100	100
Среднее количество метастазов (M±m)	11,4±2,3	12,0±2,1	5,6±0,8*#	5,6±1,1*#	12,7±2,8	9,0±1,7	5,7±1,0#
ИИМ, % по сравнению с контролем с неудаленной опухолью	-	-	50,9%	50,9%	-	21,0%	50,0%
ИИМ, % по сравнению с контролем с удаленной опухолью	-	-	53,3%	53,3%	-	25,0%	52,5%
Примечание: * - p<0,05 по сравнению с контрольной группой с удаленной опухолью по критерию Манна-Уитни; # - p<0,05 по сравнению с контрольной группой с неудаленной опухолью по критерию Манна-Уитни; n – количество животных в группе. DOX – доксорубин.							

Как следует из приведенных данных в таблице 16, у 100% животных в группе СНК-578 в дозе 10 мг/кг отмечена легкая степень метастатического поражения (LCP), в то время как в контрольной группе с неудаленным узлом 66,6% животных имели легкую степень поражения легких метастазами и 33,4% - тяжелую степень (HCP). Это подтверждает приведенные выше данные о подавлении СНК-578 процесса метастазирования и снижении тяжести поражения легких метастазами в опытной группе.

Таблица 16.

Влияние соединений на развитие процесса метастазирования у мышей с LLC при удалении первичного опухолевого узла

Группа	Степень поражения легких метастазами (%)					
	Нет метастазов	LCP		HCP		
		1	2	3	4	5
Контроль с неудал. узлом	-	44,4%	22,2%	-	-	33,4%
Контроль с удал. узлом	-	30%	50%	-	-	20%
СНК-411 25 мг/кг	-	57,1%	28,6%	-	-	14,3%
СНК-578 10 мг/кг	-	80%	20%	-	-	-
		P<0,05				
DOX, 4 мг/кг	-	37,5%	50%	-	-	12,5%
СНК-411 +DOX	-	70%	20%	-	10%	-
СНК-578 +DOX	-	70%	20%	-	-	10%

Примечание: P<0,05 – достоверность различий по сравнению с обоими контрольными группами по критерию углового преобразования Фишера. DOX – доксорубицин.

Таким образом, в поздние сроки опухолеобразования (на 14 сутки после инокуляции опухоли) были обнаружены выраженные антиметастатические свойства курсового введения СНК-411, СНК-578 и в сочетании с однократным введением доксорубицина, а также положительное влияние на выживаемость курсового введения СНК-411 и сочетания СНК-578 с доксорубицином на фоне удаления первичного опухолевого узла.

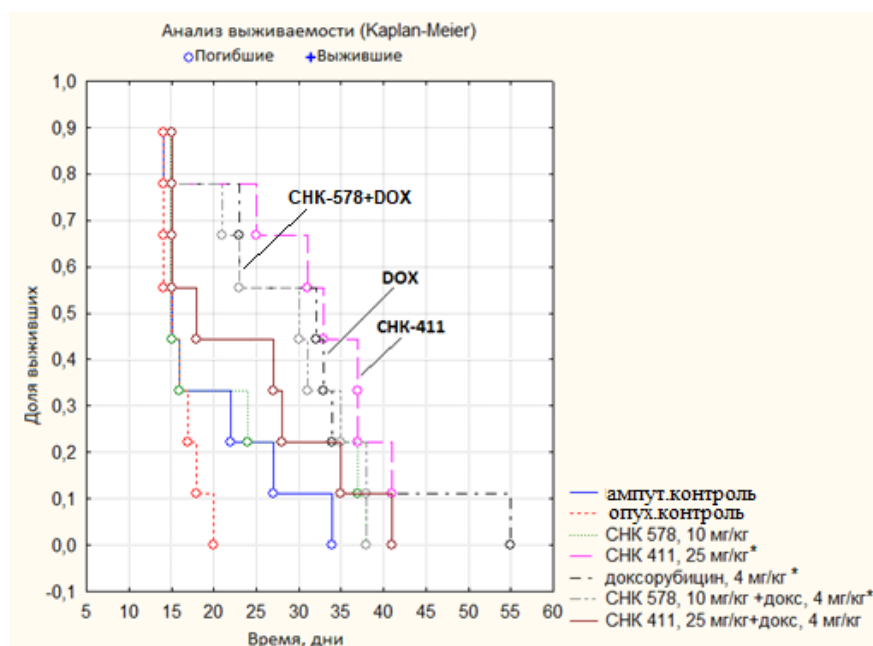


Рисунок 21. Анализ выживаемости мышей C57Bl/6 с перевиваемой LLC на фоне удаления первичного опухолевого узла по методу Kaplan-Meier. Примечание: * - $p < 0,05$ по Cox's-F тесту по сравнению с группой контроля с удаленным опухолевым узлом. Ампут. контроль – контроль №3 с удаленной опухолью, опух. контроль – контроль №2 с неудаленной опухолью.

3.3.5 Мультиплексное исследование цитокинов в сыворотке крови у животных-опухоленосителей в модели эпидермоидной карциномы легкого Lewis на фоне удаления первичного опухолевого узла методом проточной цитометрии

Влияние 8-и дневного введения СНК-411, СНК-578 и комбинации их с доксорубицином, однократного введения доксорубицина на концентрацию цитокинов IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α в сыворотке крови самцов мышей линии C57Bl/6 с LLC на фоне удаления первичного опухолевого узла проводили на проточном цитометре BD FACSCanto II методом мультиплексного определения флуоресцентных частиц (Mouse Th1/Th2 10plex Kit, eBioscience, Австрия) согласно протоколу производителя. Результаты обрабатывали в программе FlowCytoMix Pro 2.2.1 и выражали в пг/мл. Полученные данные представлены на рисунке 22 по IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ , остальные цитокины были обнаружены в единичных и незначительных количествах в каждой из опытных групп.

Провоспалительный IL-6 и плеiotропный IL-4 в сыворотке крови были обнаружены в значимых концентрациях в группах контроля с первичным опухолевым узлом и контроля с удаленным опухолевым узлом, а IL-4 и IL-5 также были определены в группе интактного контроля. В опытных группах концентрация IL-4 и IL-6 цитокинов была ниже определяемого минимального порогового значения, что говорит о выраженном подавлении проонкогенных Th2 цитокинов производными 5-оксипиримидина.

Концентрация Th2 цитокина IL-5 была обнаружена в значительных количествах во всех трех контрольных группах, в опытных группах при введении доксорубина и СНК-578 в комбинации с доксорубицином концентрация данного цитокина была на уровне контроля с неудаленным опухолевым узлом, концентрация IL-5 в остальных группах была ниже определяемого минимального порогового значения, что также свидетельствует о подавлении гемopoэтического Th2-цитокина IL-5, стимулирующего опухоль-ассоциированную эозинофилию.

Введение СНК-411, СНК-578 и их комбинаций с доксорубицином после удаления первичного опухолевого узла не подавляло концентрацию Th1-цитокина IFN- γ , что подтвердило ранее полученные нами данные об отсутствии негативного влияния производных 5- оксипиридина на IFN- γ , обладающего противовирусными и противоопухолевыми свойствами, в группах животных-опухоленосителей с РШМ-5, получавших исследуемые соединения. Подавление проонкогенных Th2 цитокинов, в том числе плейотропного IL-4, который является медиатором дифференцировки Т-лимфоцитов по Th2 типу, без изменения уровня IFN- γ является важной характеристикой поликомпонентного действия СНК-411 и СНК-578, которая вместе с их выраженными противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами объясняет механизмы их противоопухолевого и противоаллергенного действия.

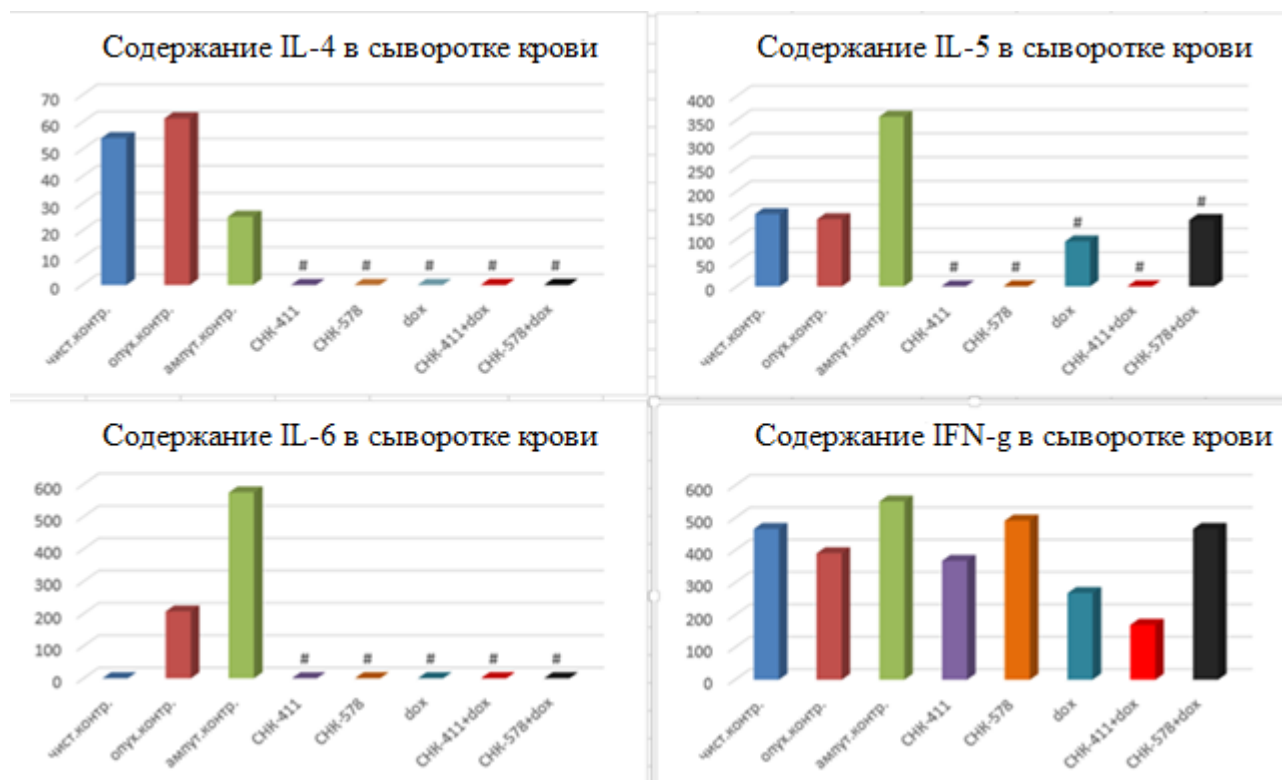


Рисунок 22. Влияние соединений СНК-411, СНК-578 и их комбинаций с доксорубицином на содержание цитокинов в сыворотке крови мышей-опухоленосителей LLC на фоне удаления первичного опухолевого узла. Примечание: #–по сравнению с группой ампут.контроля по тесту Dunnet. Чист. контр. - интактный контроль, опух. контр. – контроль №2 с неудаленным опухолевым узлом, ампут. контр. – контроль №3 с удаленным опухолевым узлом, dox – доксорубин.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Неблагоприятная экологическая обстановка, курение, стресс, хроническое воспаление, возрастные изменения показателей иммунной системы в значительной степени увеличивают риск возникновения различных форм рака. У большинства пациентов пожилого возраста происходят выраженные изменения иммунного статуса, нарушение баланса Th1/Th2-лимфоцитов со сдвигом в сторону Th2-хелперного ответа и активизацией Th2-цитокинов [82]. В связи с этим в настоящее время активно развиваются различные направления иммуноонкологии. После анализа положительных статистических и клинических данных о новых противоопухолевых средствах меняются комбинации препаратов первой и второй линии химиотерапии опухолей. В частности ингибиторы контрольных точек (PD-1/PD-L1) изменили подходы к лекарственной терапии PD-L1-позитивного немелкоклеточного рака легкого и занимают прочное место в лечении НМРЛ как в 1-й, так и в последующих линиях терапии. Гемцитабин успешно применяется при лечении НМРЛ в первой линии терапии [48]. Применение фторпиримидинов, в настоящее время совместно с платиносодержащими препаратами и с метилурацилом, при заболеваниях желудочно-кишечного тракта остается актуальным уже в течение нескольких десятилетий. Большинство противоопухолевых препаратов обладают достаточно выраженной токсичностью, что вместе с усилением опухолевого процесса приводит к уменьшению медианы выживаемости, которая и в настоящее время является золотым стандартом, характеризующим противоопухолевую активность лекарственных средств. В связи с этим необходим поиск иммуотропных соединений не только с таргетным механизмом действия, но и малотоксичных препаратов поликомпонентно действующих на опухоль и ее микроокружение. Увеличение в сыворотке крови онкопациентов уровней провоспалительного IL-6, Th2-цитокинов IL-4 и IL-10, IL-17A и ряда других интерлейкинов указывает на неблагоприятный прогноз течения заболевания [46], поэтому актуален поиск препаратов, стабилизирующих баланс Th1/Th2-лимфоцитов и цитокинов и уменьшающих цитотоксичность известных цитостатиков.

В работах О.С.Кузнецовой с соавторами на модели LLC были определены иммунофармакологические, противовоспалительные и противоопухолевые свойства 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина (СНК-411) [37]. Если вначале доксорубицин и фторафур применялись для верификации используемых противоопухолевых моделей, в наших работах мы учитывали прооксидантные свойства и выраженную токсичность доксорубицина и противовоспалительные свойства малотоксичных производных 5-оксипиримидина для возможного совместного курсового введения СНК-411 с введением доксорубицина. Однако применяемый нами доксорубицин (доксорубицина гидрохлорид, ЭБЕВЕ Фарма Гес.м.б.Х.НФГ.КГ, Австрия) показал в наших опытах выраженную, сопоставимую с литературными данными токсичность (LD₅₀ при

в/б введении в опытах на мышах составила 10,8 мг/кг), при двукратном введении мышам-опухоленосителям в дозе 4 мг/кг 2 животных из 10 погибали, поэтому в следующих работах мы вводили доксорубицин однократно в дозе 4 мг/кг. В отделе химии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова» было синтезировано хорошо растворимое в воде соединение СНК-578 (хлоргидрат 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина), которое по t^0 плавления и ряду других характеристик химического соединения отличалось от СНК-411, поэтому в настоящей работе были впервые изучены его противовоспалительные, иммуностропные и противоопухолевые свойства в сравнении с СНК-411 и в сочетании с однократным введением доксорубицина.

Оценка профиля активности соединения СНК-578 включала исследование иммуностропных свойств в качестве монотерапии и при совместном введении с доксорубицином, а также изучение его противовоспалительных, противоаллергенных и противоопухолевых свойств в сравнении с СНК-411 и в сочетании с однократным введением доксорубицина. Проведенные исследования показали, что производные 5-оксипиримидина в различной степени обладают иммуномодулирующими, противовоспалительными и противоопухолевыми свойствами.

В отличие от СНК-411, стимулирующего гуморальный и клеточный иммунный ответ [37], 3-х кратное в/б введение СНК-578 в дозе 10 мг/кг не стимулировало антителообразование. Комбинация СНК-578 (10 мг/кг) с доксорубицином (4 мг/кг) достоверно подавляла Th2-гуморальный ответ у мышей линий СВА и С57В1/6. Согласно данным литературы [143], доксорубицин является иммунодепрессантом, это свойство используется при трансплантации костных тканей после удаления опухоли. СНК-578 в дозе 10 мг/кг значительно стимулировал Th1-клеточный иммунный ответ. Сенсibilизация ЭБ в реакции гиперчувствительности замедленного типа вызывает образование антигенспецифических Т-лимфоцитов, которые при повторном введении антигена взаимодействуют и выделяют множество провоспалительных цитокинов – развивается воспалительная реакция. Таким образом, ГЗТ является достоверным показателем функциональности клеточного иммунного ответа. Согласно данным литературы [87], простые пиримидины стимулируют клеточный иммунный ответ, обладают интерферон-индукторной активностью, стимулируют процессы пролиферации В-лимфоцитов и усиливают синтез антител.

В результате оценки фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов и оценки генерации активных форм кислорода методом люминол-зависимой клеточной хемилюминесценции, было показано, что СНК-578 в дозах 10 мг/кг, 25 мг/кг и комбинации с доксорубицином не приводил к значимому изменению фагоцитарного индекса и показателей хемилюминесцентного ответа нейтрофилов на опсонизированный зимозан. Согласно результатам ранее проведенных исследований Кузнецовой О.С. [37], соединение СНК-411 в дозе 50 мг/кг значительно увеличивало фагоцитарный индекс по сравнению с контрольной группой, но также не приводи-

ло к значимому изменению показателей хемилюминесцентного ответа нейтрофилов на опсонизированный зимозан.

При исследовании массы и клеточности органов иммунной системы, клеточность селезенки значимо уменьшилась в группе мышей, получавших СНК-578 в дозах 10 мг/кг и 25 мг/кг. Клеточность тимуса так же достоверно уменьшилась в 2 раза в группах, получавших СНК-578 в дозе 25 мг/кг или комбинацию СНК-578 (10 мг/кг) с доксорубицином. Масса тимуса была значимо снижена под влиянием комбинации СНК-578 с доксорубицином по сравнению с данными группы контроля. Таким образом, при изучении влияния СНК-578 на показатели иммунного ответа было выявлено, что они несколько отличаются от иммуностропности СНК-411. Полученные результаты указывают на возможно более выраженное цитостатическое действие соединения СНК-578, особенно в комбинации с доксорубицином, что необходимо подтвердить в дальнейших исследованиях. В ранее проведенном МТТ-тесте в работе Кузнецовой О.С. было показано [39], что соединение СНК-411 в концентрациях 10^{-4} и 10^{-5} уменьшало долю жизнеспособных клеток К-562 на 36,0% и 18,1%, соответственно.

В настоящее время определена опухолеобразующая роль хронического воспаления, в частности около 20% случаев различных типов рака вызвано хроническим воспалением [123]. В связи с этим, поиск новых противоопухолевых соединений с противовоспалительной активностью, участвующих в регуляции оппозиционных групп Th1- и Th2-цитокинов и в подавлении активации «альтернативного» пути иммунного ответа рассматривается перспективным направлением иммунотерапии рака [252]. При изучении противовоспалительных свойств у производных 5-оксипиридина использовали реакцию воспаления на Кона в опытах на мышах линии СВА и экссудативное воспаление на каррагенан в опытах на крысах. Однократное внутрибрюшинное введение СНК-411 и СНК-578 в дозе 10 мг/кг приводило к выраженному подавлению реакции воспаления на Кона. Введение СНК-411 и СНК-578 в дозе 25 и 50 мг/кг также подтвердило противовоспалительную активность соединений в виде значимого подавления реакции более чем в два раза. Таким образом, в реакции воспаления на Кона производные 5-оксипиридина СНК-411 и СНК-578 в диапазоне доз 10-50 мг/кг при внутрибрюшинном введении обладают выраженной противовоспалительной активностью, сопоставимой с диклофенаком. По данным Кузнецовой О.С. [37], СНК-411 демонстрировал выраженные противовоспалительные свойства *per os* в дозах 25, 50 и 100 мг/кг, сопоставимые с действием препарата сравнения диклофенака, снижая индекс реакции более чем в два раза.

Согласно исследованиям, проведенным в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В. В. Заскусова» в лаборатории мутагенеза отдела лекарственной токсикологии³, в режиме предобработки циклофосфамидом в дозе 50 мг/кг, изучалось действие соединения СНК-411 и СНК-578 в дозах 10 мг/кг, 25 мг/кг и 50 мг/кг. СНК-411 достоверно подавлял действие циклофосфамида в дозе 50 мг/кг. В режиме предобработки диоксидином в дозе 200 мг/кг, СНК-411 выражено подавлял его действие во всех дозах (10 мг/кг, 25 мг/кг и 50 мг/кг), что указывает на его антиоксидантное действие, которое нужно подтвердить и на других моделях.

Для исключения межвидовых различий в действии производных 5-оксипириимидина и подтверждения их противовоспалительной активности было проведено исследование их действия на модели острого экссудативного отека на каррагенан у крыс. Каррагенан, сульфатированный полисахарид, в результате стимулирования выделения гистамина и простагландинов вызывает острую воспалительную реакцию при субплантарном введении 1% раствора. Тест на каррагенан был введен в практику при разработке индометацина и применялся для определения подавления ЦОГ-2. Результаты исследования показали, что введение СНК-578 в дозе 10 мг/кг выражено в 2,4-3,5 раза подавляло воспалительную реакцию у крыс по сравнению с контрольной группой на протяжении всего опыта, при этом максимальная выраженность эффекта наблюдалась на третий час регистрации отека лапы. У животных, получавших комбинацию соединений СНК-411 (25 мг/кг) или СНК-578 (10 мг/кг) с доксорубицином (4 мг/кг), каррагенан-индуцированный отек также значительно уменьшался в течение всего опыта. В ранее проведенных исследованиях Кузнецовой О.С. СНК-411 в дозах 10, 25, 50 мг/кг также показывал выраженную противовоспалительную активность [37], сравнимую с диклофенаком, и значительно подавлял реакцию воспаления ($p < 0,01$) на протяжении всего опыта в 2,2-3,6 раз.

Таким образом, выраженная противовоспалительная активность производных 5-оксипириимидина указывают на подавление СНК-411 и СНК-578 ЦОГ-2, что необходимо изучить в дальнейшем для понимания механизмов противовоспалительной и противоопухолевой активности 5-оксипириимидина.

В экспериментальных и клинических работах уже многие годы дискутируется вопрос о связи между аллергией и раком [7;49;156;243], в частности, что при наличии аллергического заболевания вероятность заболеть раком маловероятна или отсутствует. Согласно гипотезе об иммунологическом надзоре, аллергия является следствием гиперчувствительности иммунной системы, которая способна эффективно распознавать и уничтожать предраковые аутологичные клетки до начала развития онкологического заболевания [224]. Исходя из данной теории, паци-

³ Исследование проведено старшим научным сотрудником лаборатории фармакологии мутагенеза, кандидатом биологических наук Кулаковой А.В.

енты с аллергическими заболеваниями обладают усиленным противоопухолевым иммунным ответом и имеют наименьший риск развития онкологии. Однако, этот усиленный иммунный ответ приводит и к усилению реакции на различные аллергены, такие как пыльца, плесень, гельминты. Другими словами, проявляющиеся симптомы аллергии являются вторичными эффектами гиперчувствительного иммунитета и не способствуют развитию рака.

У пациентов с бронхиальной астмой зачастую наблюдается хроническое воспаление дыхательных путей, что, возможно, играет одну из ключевых, решающих ролей в патогенезе рака легких вследствие стойкого окислительного повреждения тканей, приводящего к мутациям генов-супрессоров развития и пролиферации малигнизированных клеток – от данного факта берет начало теория антигенной стимуляции МакВортера [243]. Эта теория предполагает, что аллергия приводит к хроническому воспалению и стимуляции пролиферации и роста клеток, что увеличивает вероятность мутаций в активно делящихся клетках. Согласно гипотезе антигенной стимуляции, симптомы аллергии напрямую увеличивают риск развития рака в хронически воспаленных тканях и органах.

Ввиду множества противоречивых теорий было положено начало развитию новой области исследований – аллергоонкология, которая направлена на определение взаимосвязи между раком и Th2-иммунным ответом [152;243]. Эпидемиологические исследования выявили обратную связь между аллергическим заболеванием и различными злокачественными опухолями, что в дальнейшем привело к предположению, что IgE, возможно, обладает способностью разрушать опухолевые клетки [243]. В небольших концентрациях иммуноглобулину IgE свойственно вызывать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и реакции фагоцитоза (ADCP). Неспецифическое связывание IgE с опухолевыми клетками также может являться мощным индуктором формирования опухолеспецифической иммунологической памяти. IgE также способен связываться с эозинофилами, тучными клетками и макрофагами, что теоретически может превращать их в мощное противоопухолевое средство [243].

В последнее время множество исследований посвящено изучению миелоидных супрессорных клеток (MDSCs), которые продуцируются костным мозгом [202]. Данные клетки обладают выраженными иммуносупрессивными свойствами, их количество увеличивается при хронических инфекционных или онкологических заболеваниях. Накопление миелоидных клеток в опухоли подавляет иммунный ответ и ассоциировано с неблагоприятным прогнозом. Миелоидные супрессорные клетки секретируют Th2-цитокины, в частности IL-4 и IL-13, которые способствуют дифференцировке Т-клеток в Th2-тип, а также IL-6 и TGF- β , которые являются хемоаттрактантами для тучных клеток. Т-клетки не только вносят вклад в пул IL-4 и IL-13, но также стимулируют синтез IgE, который, в свою очередь, дополнительно активирует тучные клетки. Эти механизмы образуют самоподдерживающийся цикл “тучные клетки \leftrightarrow MDSCs”, что

приводит к увеличению выживаемости, активации и пролиферации миелоидных супрессорных клеток, в дополнение к усилению Th2-иммунного ответа. Этот дисбаланс в сторону Th2-иммунного ответа наблюдается при аллергическом заболевании или злокачественной неоплазии, что негативно сказывается на течении болезни и дальнейшем прогнозе, однако полезен для борьбы с паразитарными заболеваниями. Таким образом, существуют общие, IgE-опосредованные механизмы в течении аллергических и онкологических заболеваний, однако многие моменты остаются на данный момент малоизученными и требуют дальнейших масштабных исследований.

В последние годы в клинических исследованиях было установлено, что при высокой концентрации IgE в сыворотке крови больных (более 10 000 мЕ/мл) выявлены различные раковые и аутоиммунные заболевания, т.е. выраженный сдвиг в сторону Th2-иммунного ответа может привести не только к аллергическим, но и к аутоиммунным и раковым заболеваниям [49]. Согласно экспериментальным и клиническим исследованиям последних лет [252], плейотропный IL-4 действует как опухоль-стимулирующий цитокин и играет ключевую роль в течение опухолевой прогрессии, а блокада IL-4 замедляет опухолевый рост и продлевает выживаемость мышей с различными опухолями. Интерлейкины IL-4 и IL-13 являются основными стимулами для «альтернативной» активации иммунного ответа, который в свою очередь приводит к развитию различных Th2-ассоциированных аллергических или раковых заболеваний [49], в основе которых лежит Th2-воспаление [41]. Согласно современным представлениям о так называемом аллергическом воспалении, IL-4, IL-13 играют ключевую роль в так называемом T2-воспалении, активируя множественные медиаторы и типы клеток, участвуя в дифференцировке Т-лимфоцитов и переключении В-лимфоцитов на продукцию специфического IgE, способствуют миграции эозинофилов в ткани и патологическому ремоделированию дыхательных путей. Воспаление 2-го типа играет важную роль в патогенезе астмы и атопического дерматита и ряда других заболеваний. Соответственно, цитокинами, играющими ведущую роль в развитии данных заболеваний, являются IL-4, IL-5 и IL-13, которые стали потенциальными терапевтическими мишенями и против них в настоящее время применяются моноклональные антитела Дупилумаб (против IL-4, IL-13), Меполизумаб, Реслизумаб, Бенрализумаб (против IL-5). Если у пациента с высокой частотой обострений имеется выраженное эозинофильное воспаление (эозинофилы крови ≥ 300 кл/мкл, применяется анти-IL-5-терапия) [43].

По данным О.С.Кузнецовой с соавторами [38] СНК-411 выражено подавлял уровень плейотропного IL-4 и провоспалительного IL-6 в сыворотке крови мышей на 16 день опыта после имплантации LLC, что указывало на его возможные противовоспалительные и противоаллергенные свойства. Согласно данным литературы [21], производное пиримидина гидроксипиридина гидроксиэтилдиметилдигидропиридин – препарат Ксимедон уже 20 лет успешно применяется в кли-

нической практике при различных заболеваниях. Препарат подавлял уровень IgE в сыворотке больных поллинозами, в связи с чем был рекомендован для профилактического применения весной в период цветения растений. В связи с этим мы решили изучить наличие противоаллергенных свойств у производных 5-оксипиримидина. Для определения противоаллергенных свойств была выбрана модель общей системной анафилаксии на классический аллерген овалбумин в опытах на морских свинках альбиносах. При иммунизации животных 0,6% раствором БКЯ, в контрольной группе наблюдалась реакция анафилаксии различной степени тяжести (индекс по Weigle 2,5). СНК-578 в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг значительно снижал индекс анафилактической реакции в 2,8 и в 10 раз. При иммунизации 1% раствором БКЯ, вызывавшим 100% гибель в контроле от анафилактического шока (индекс по Weigle 4,0), СНК-411 в дозе 50 мг/кг уменьшал индекс анафилактической реакции по Weigle на внутрисердечное введение овалбумина 1,8 раза.

Таким образом, производные 5-оксипиримидина СНК-411 и СНК-578 также обладают противоаллергенным действием. Высокмолекулярные противоопухолевые моноклональные антитела в качестве побочного действия часто вызывают аллергические осложнения. Наличие противоаллергенной активности может служить признаком, по которому имеет смысл изучить совместное противоопухолевое действие производных 5-оксипиримидина с таргетными моноклональными антителами, такие как Ритуксимаб, Ипилимумаб, Авелумаб, Ниволумаб, вызывающими гиперчувствительность.

Согласно мировой статистике ВОЗ, рак является второй из основных причин смерти – примерно каждый шестой смертельный случай приходится на онкологическое заболевание. Наиболее распространенный вид онкологии, рак легких, отличается агрессивным течением и плохим прогнозом - на сегодняшний момент, полихимиотерапия зачастую оказывается бесильной, а выживаемость остается низкой. Факторами риска развития различных видов рака являются некоторые возбудители инфекционных заболеваний, в том числе *Helicobacter pylori*, вирус гепатита В и С, вирус Эпштейна-Барра и определенные типы вируса папилломы человека. Последний является доказанным иницирующим фактором развития рака шейки матки. РШМ, в свою очередь, занимает второе место среди опухолевых заболеваний органов женской половой системы. В связи с этим, разработка противоопухолевых средств остается одним из первоочередных, наиболее значимых и перспективных направлений в сфере фармакологических исследований.

В наших исследованиях на модели карциномы легкого Lewis (LLC) курсовое двухнедельное введение соединения СНК-578 в дозе 10 мг/кг вызвало на 7 сутки после окончания введения выраженное (в 3,6 раза) торможение роста объема опухоли на 72,2% ($p < 0,05$). Подавление роста опухоли (в 2,2 раза) было также значимым при сочетанном курсовом введении СНК-

411 в дозе 25 мг/кг и однократном введении доксорубицина в дозе 4 мг/кг, на 7 день после прекращения курсового введения ТРО составило 55,2%. Анализ выживаемости мышей с LLC методом Kaplan-Meier выявил значимое увеличение выживаемости животных в группе, получавших СНК-578 в дозе 10 мг/кг, где медиана продолжительности жизни составила 43 дня, по сравнению с группой активного контроля, в которой медиана достигла 28 дней. Увеличение продолжительности жизни (УПЖ) в этой опытной группе через 2 месяца после инокуляции LLC значимо возросло на 38,6% по сравнению с контрольной группой, при этом у 2 из 10 мышей опухоль не развилась. Полученные данные указывают на выраженную противоопухолевую активность СНК-578 на модели LLC и наличие синергизма действия при совместном курсовом введении СНК-411 и однократном введении доксорубицина на модели LLC.

Наибольший противоопухолевой эффект был определен при введении СНК-578 на модели рака шейки матки (РШМ-5) в опытах на мышах самках линии СВА. Через 7 дней после окончания введения соединений СНК-411 в дозе 25 мг/кг значимо подавляло рост массы опухоли - торможение роста опухоли (ТРО) составило 42,7%. Курсовое введение СНК-578 в дозе 10 мг/кг выражено снижало рост массы опухоли в 7,4 раза (ТРО составило 86,6%).

Для определения одного из возможных механизмов противоопухолевого действия СНК-411 и СНК-578 было проведено исследование концентраций различных цитокинов в сыворотке крови мышей-опухоленосителей через 7 дней после окончания введения производных 5-оксипиримидина на модели РШМ-5. Концентрация Th1-цитокина IFN- γ в сыворотке крови во всех опытных группах снижена не была. Курсовое введение соединения СНК-578 значимо подавляло уровень цитокина IL-6, Th2-цитокина IL-10 и Th17-цитокина IL-17A в сыворотке крови до уровня активного контроля. Введение СНК-411 значимо подавляло уровень IL-10 и IL-17A по сравнению с группой контроля с опухолью. Таким образом, курсовое введение производных 5-оксипиримидина в режиме монотерапии значимо подавляют уровни провоспалительных IL-10 и IL-17A.

Повышение с возрастом частоты и тяжести течения онкологических заболеваний свидетельствует о подавлении функциональной активности иммунной системы. С возрастом снижается неспецифическая и специфическая защита, с чем связано повышение чувствительности людей преклонного возраста к опухолям. Подавляется, в основном, популяция Th1-хелперов в результате возрастной инволюции тимуса (к 60-70 годам остается 10% от исходного объема в виде фиброзированного остатка), нарушается баланс Th1/Th2-лимфоцитов. Процесс старения сопровождается усилением продукции IL-6 и IL-4, которые обладают способностью ингибировать функции Th1-лимфоцитов [82].

В настоящее время есть убедительные данные [262], что IL-6 является связующим звеном сигнального пути JAK/STAT 3 между воспалением и стимуляцией пролиферации раковых

клеток и метастазирования многих видов рака. IL-6 является одним из наиболее характерных проонкогенных цитокинов. Члены его семейства включают IL-11, IL-27, IL-31, онкостатин М (OSM), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), кардиотрофин-1 (СТ-1), которые влияют на пролиферацию, дифференцировку, метастазирование, ангиогенез, выживаемость и метаболизм клеток. Члены семейства IL-6 активируют множество сигнальных путей, среди которых STAT3 признан главным онкогенным фактором и ключевым звеном, связывающим воспаление и рак.

При начальном изучении влияния цитокинов на разных стадиях хронического воспаления в организме человека и экспериментальных животных выводы об их действии часто бывают противоречивыми, однако с накоплением экспериментальных и клинических данных формируется общее представление о механизмах их действия. По данным литературы Th17-клетки и их цитокины (IL-17A и IL-17F) ассоциированы с различными аутоиммунными и воспалительными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, рассеянный склероз, псориаз [120]. Проонкогенное действие IL-17 наблюдается во многих раковых образованиях, IL-17 и IL-17A участвуют в ангиогенезе, у мышей с меланомой B-16 и с раком мочевого пузыря (MB49 bladder carcinoma), стимулируют синтез IL-6 и активируют сигнальный путь STAT 3 [254]. По мнению Joerger M., Finn S., Cuffec S. и соавторов [154], иммунотерапия, нацеленная на иммуномодулирующие цитокины при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ), в том числе в пределах оси IL-17 – Th1/ Th17 имеет перспективы для разработки эффективного лечения НМРЛ. В доклинических исследованиях у мышей, нокаутных по IL-17, наблюдалась повышенная устойчивость к росту опухоли, что также указывает на то, что IL-17 способствует развитию злокачественных новообразований [245]. IL-17A активирует различные клетки, имеющие важное значение для формирования микроокружения опухолей, стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов, участие Th17-лимфоцитов и IL-17 в усилении роста опухоли дает основание рассматривать их как возможные мишени для терапии. Согласно полученным данным, одним из возможных механизмов действия СНК-411 и СНК-578 является их влияние на сигнальный путь STAT 3, учитывая подавление уровней IL-17A и IL-6 и проонкогенное действие этих цитокинов через STAT 3.

IL-10 вырабатывается различными иммунными и опухолевыми клетками, данный цитокин способен ингибировать действие Th1-хелперных клеток, необходимых для борьбы со злокачественными новообразованиями. В клинических исследованиях тканей легкого человека с диагнозом НМРЛ и в доклинических исследованиях культур аналогичных опухолевых клеточных линий была обнаружена положительная корреляция между экспрессией IL-10 и его рецепторов IL-10R [248]. Было отмечено, что высокие уровни IL-10 в ТАМ коррелировали со стадией, размером опухоли и количеством метастазов, что, вероятно, играет немаловажную роль в

прогрессировании рака легкого [253]. Тем не менее, данные по механизму действия ПЛ-10 достаточно неоднозначны и противоречивы.

Пиримидиновые производные, в частности фторсодержащие пиримидины, нашли широкое применение в качестве противоопухолевых антиметаболитов, они более 50 лет являются препаратами первой линии при терапии онкологических заболеваний ЖКТ. Пиримидиновые противоопухолевые соединения нарушают в опухолевых клетках действие ферментов тимидилатсинтетазы (фторурацил), ДНК-полимеразы (цитарабин) и рибонуклеотидредуктазы (гемцитабин). В частности, гемцитабин, препарат первой линии при НМРЛ, обладая умеренной токсичностью, демонстрирует выраженную противоопухолевую активность в фармакотерапии ряда солидных опухолей (НМРЛ, рак молочной железы и яичников). Однако, его отрицательным свойством, как и у многих других противоопухолевых химиотерапевтических препаратов, является высокая гематологическая токсичность.

Центральным остается вопрос о механизме противоопухолевого действия изучаемых производных 5-оксипиримидина. Он может существенно отличаться от действия фторсодержащих пиримидинов. В механизме действия СНК-411 и СНК-578 могут гармонично сочетаться противоопухолевая, противовоспалительная и иммуностропная компоненты, что может быть выигрышным с точки зрения перспектив дальнейшей разработки малотоксичных соединений этого ряда в качестве средств противоопухолевой терапии. Согласно полученным данным, возможными механизмами противоопухолевого действия СНК-411 и СНК-578 является их влияние на проонкогенный сигнальный путь STAT 3, подавление ЦОГ-2, подавление Th2- и Th17-хелперного ответа. Отсутствие подавления производными 5-оксипиримидина Th1-цитокина IFN- γ очень важно при начальных стадиях рака шейки матки, а именно дисплазии, которая, как известно, вызвана вирусом папилломы человека (ВПЧ), на который действует IFN- γ , а также и при других вирусных инфекциях.

Согласно требованиям методических указаний по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ [78] у изучаемых соединений есть несколько критериев противоопухолевой эффективности. Соединения нового класса, обладающие противоопухолевой активностью и рекомендуемые для клинического изучения, должны соответствовать одному или более из следующих критериев эффективности:

1. Торможение роста хотя бы одной опухоли из обязательных к изучению спектра на 90% и более, сохраняющееся не менее 7 суток после отмены вещества;
2. Торможение роста не менее трех солидных опухолей на 70% и более с сохранением значимого эффекта не менее 7 суток;
3. Увеличение продолжительности жизни животных с солидной или асцитной опухолью на 50% и более;

4. Новый, ранее неизвестный механизм действия (при наличии существенной противоопухолевой активности).

Суммируя вышеописанные результаты проведенных исследований, полученные данные по изучению противоопухолевой активности производных 5-оксипиримидина указывают на перспективность дальнейшего изучения противоопухолевых свойств и механизма действия соединений СНК-411 и СНК-578: при курсовом введении СНК-578 (10 мг/кг) было подтверждено торможение роста опухоли более чем на 70% на двух опухолевых моделях (LLC – ТРО 72%, РШМ-5 – ТРО 86%), также зарегистрировано увеличение продолжительности жизни (УПЖ) на модели LLC СНК-578 (10 мг/кг) на 38%, на фоне удаления первичного опухолевого узла LLC при в/б введении СНК-411 в течение 8-ми дней в дозе 25 мг/кг УПЖ составило 60,2%.

Метастазирование – процесс образования вторичных злокачественных опухолевых очагов в результате инвазии отдельных малигнизированных клеток в лимфатические и кровеносные сосуды, транспорта и экстравазии в соседние органы – является финальным этапом развития онкологического заболевания и зачастую оказывается причиной невозможности полного излечения от рака. Отдельные виды онкологии заканчиваются в большинстве случаев летальным исходом из-за молниеносного распространения метастазов по всему организму – например, в случае меланомы, мелкоклеточного рака легкого, рака крови (лейкоза).

Согласно ранее полученным в нашей лаборатории данным соединения СНК-411 и СНК-578 обладают выраженной антиметастатической активностью на моделях карциномы легкого Льюис (LLC) и меланомы В-16 в присутствии первичного опухолевого узла. Наиболее выраженный антиметастатический эффект на модели меланомы В-16 показала монотерапия СНК-578 в дозах 10 мг/кг (75,8%) и 25 мг/кг (92,3%). При совместном введении с доксорубицином в дозе 4 мг/кг были выявлены метастазы только первой степени LCP (легкая степень метастатического поражения) или отсутствовали совсем: у 6 из 9 мышей метастазы отсутствовали, у трех обнаружили по 1, 2 и 3 очень мелких метастаза, а подавление метастазирования достигло 98,9% [58]. При курсовом введении СНК-411 в дозе 10 и 25 мг/кг индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) достиг 72% и 82,9%, соответственно. На модели LLC при оценке метастазирования в легких на 21 сутки после инокуляции опухоли было установлено, что ИИМ при курсовом введении СНК-411 в дозе 50 мг/кг составил 61,4%, фторафура – 48,8%, доксорубицина – 40,1%.

Далее при морфологическом исследовании гистологических срезов зафиксировано максимальное уменьшение площади метастазов по отношению площади легких у мышей на фоне доксорубицина, затем – на фоне СНК-411, что указывает на перспективность совместного применения высокотоксичного доксорубицина в малых дозах и СНК-411.

Соединения, обладающие антиметастатической активностью и перспективные для апробации в клинике, должны эффективно ингибировать процесс спонтанного метастазирования

перевиваемых опухолей в присутствии первичного опухолевого узла на 35-75%. Однако при определении антиметастатических свойств изучаемых соединений необходимо также проверить их антиметастатическую активность на фоне удаления первичного опухолевого узла [20].

В нашей работе на модели карциномы легкого Льюис (LLC) с удалением первичного опухолевого узла у мышей C57BL/6, с последующим 8-ми дневным введением производных 5-оксипиримидина отдельно и совместно с доксорубицином, индекс ингибирования метастазирования (ИИМ=53,3%) в легких мышей был значимым при курсовом в/б введении СНК-578 в дозе 10 мг/кг и СНК-411 в дозе 25 мг/кг по сравнению с контрольной группой с неудаленной (ИИМ=50,9%) и с удаленной опухолью (ИИМ=53,3%). При курсовом введении СНК-578 в дозе 10 мг/кг в сочетании с однократным введением доксорубицина в дозе 4 мг/кг ИИМ (50% и 52,5%, соответственно) был значимым по сравнению с активным контролем с неудаленной опухолью. На 30 день после инокуляции опухоли в стопу наибольшая медиана выживаемости по Kaplan-Meier, Cox's F-Test определена у мышей-опухоленосителей, которым в течение 8-ми дней в/б вводили СНК-411 в дозе 25 мг/кг (33 дня) и при однократном введении доксорубицина в дозе 4 мг/кг (32 дня).

В данном исследовании было также проведено мультиплексное исследование концентраций 10-ти различных цитокинов в сыворотке крови мышей-опухоленосителей на модели РШМ-5. При курсовом введении производных 5-оксипиримидина *per se* и в сочетании с однократным введением доксорубицина в сыворотке крови животных не обнаруживали проонкогенных Th2 цитокинов IL-4 и IL-6, не выявляли понижения Th1 цитокина IFN- γ , содержание Th2 цитокина IL-5 было значимо снижено.

Таким образом, в настоящем исследовании на фоне удаления первичного опухолевого узла было определено антиметастатическое действие соединений СНК-411 и СНК-578, положительное влияние СНК-411, доксорубицина и совместного в/б введения СНК-578 с доксорубицином на выживаемость и подавление уровней Th2 цитокинов.

В настоящем исследовании были впервые обнаружены противоопухолевые и антиметастатические свойства СНК-578 в сравнении с СНК-411 и в сочетании с однократным введением доксорубицина, на разных моделях выявлено выраженное противовоспалительное и противоаллергенное действие производных 5-оксипиримидина, указывающие на регуляторных характер их действия в сторону подавления Th2- и Th17-иммунного ответа.

ВЫВОДЫ

1. Производное 5-оксипиримидина СНК-578 в дозах 10 мг/кг и 25 мг/кг не стимулирует гуморальное звено иммунитета, в комбинации с доксорубицином подавляет антителообразование у мышей СВА и С57ВL/6. СНК-578 в дозе 10 мг/кг повышает клеточный иммунный ответ. СНК-411 в дозах 25-50 мг/кг повышает антителообразование и индекс гиперчувствительности замедленного типа. СНК-578 в дозе 10 мг/кг снижает клеточность селезенки, в дозе 25 мг/кг – клеточность селезенки и тимуса у самцов мышей F₁(СВАхС57ВL/6).
2. СНК-578 в дозах 10-50 мг/кг подавляет острое экссудативное воспаление на каррагенан у аутбредных самцов крыс и воспаление на Кона у мышей самцов линии СВА. СНК-411 имеет сходный спектр противовоспалительной активности.
3. На модели системной анафилаксии при иммунизации морских свинок 0,6% раствором овальбумина СНК-578 в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг снижает индекс анафилактической реакции в 2,8 и в 10 раз. При иммунизации 1% раствором овальбумина, вызывающей гибель 100% животных, СНК-411 в дозе 50 мг/кг обеспечивает выживаемость животных и в 1,8 раза уменьшает индекс анафилактической реакции.
4. Торможение роста опухоли РШМ-5 под действием СНК-411 в дозе 25 мг/кг составляет 42,7%, в тех же условиях СНК-578 в дозе 10 мг/кг тормозит рост опухоли на 86,6%.
5. На модели РШМ-5 курсовое введение СНК-411 в дозе 25 мг/кг подавляло уровень цитокинов IL-10 и IL-17A, СНК-578 в дозе 10 мг/кг - IL-6, IL-10 и IL-17A по сравнению с контролем с опухолью.
6. На модели LLC СНК-578 в дозе 10 мг/кг ингибирует рост опухоли на 72,2%, увеличение продолжительности жизни составляет 38,6%. При сочетанном курсовом введении СНК-411 в дозе 25 мг/кг и однократном введении доксорубицина в дозе 4 мг/кг зарегистрировано снижение объема опухоли на 55,2%.
7. При курсовом введении СНК-578 в дозе 10 мг/кг в/б и СНК-411 в дозе 25 мг/кг в/б после удаления первичного опухолевого узла LLC индекс ингибирования метастазирования составил 53,3% в обоих случаях, при введении СНК-578 в дозе 10 мг/кг в сочетании с однократным введением доксорубицина в дозе 4 мг/кг индекс ингибирования метастазирования составил 52,5%. СНК-411 в дозе 25 мг/кг в/б увеличивал продолжительность жизни на 60,2 %.
8. На модели LLC на фоне удаления первичного опухолевого узла при курсовом введении СНК-411 и СНК-578 *per se* и в сочетании с однократным введением доксоруби-

цина в сыворотке крови животных не обнаружено проонкогенных Th2 цитокинов IL-4 и IL-6, не выявлено понижения Th1 цитокина IFN- γ , содержание Th2 цитокина IL-5 было снижено.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Производные 5-оксипиримидина соединения СНК-411 и СНК-578 являются перспективными для дальнейшего углубленного изучения механизмов их фармакологической активности - противовоспалительных, противоаллергенных, противоопухолевых и антиметастатических свойств и определения возможных направлений разработки на их основе новых средств фармакотерапии опухолей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК-активная форма кислорода

БКЯ-белок куриного яйца

в/б-внутрибрюшинно

в/с-внутрисердечно

ВПЧ-вирус папилломы человека

ГЗТ-гиперчувствительность замедленного типа

ГФДГ-глицерофосфатдегидрогеназа

ДНК-дезоксирибонуклеиновая кислота

ИИМ-индекс ингибирования метастазирования

КонА- конканавалин А

КПЭ-клетки перитонеального экссудата

КТ-компьютерная томография

МРЛ-мелкоклеточный рак легкого

МРТ-магнитно-резонансная томография

МТТ- колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток

НМРЛ-немелкоклеточный рак легкого

РЛ-рак легкого

РНК-рибонуклеиновая кислота

РПГА-реакция пассивной гемагглютинации

РШМ-рак шейки матки

СПЖ-средняя продолжительность жизни

ТРО-торможение роста опухоли

УПЖ-увеличение продолжительности жизни

ХЛ-хемоллюминесценция

ЭБ-эритроциты барана

ЯСК-ядросодержащие клетки

ADAM-белковая пептидаза

ADCC-антитело-зависимая клеточная цитотоксичность

ADCP-реакция фагоцитоза

Акт-протеинкиназа В

Ang-2-ангиопоэтин

BCL-белок клеточной лимфомы, фактор транскрипции

CCL2(MCP-1)- CC2-хемокин

CIN-цервикальная интраэпителиальная неоплазия

CSF-колониестимулирующий фактор

CTLA-4-белок, ассоциированный с цитотоксическим лимфоцитом

DC-дендритная клетка

DPD-дигидропиримидиндегидрогеназа

dUTP-дезоксидеозин трифосфат

EGFR-рецептор эпидермального фактора роста

EML4-ALK-химерный ген при раке легкого

FDA-Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов

FdUMP- фтородезоксидеозина монофосфат

FdUTP- фтородезоксидеозина трифосфат

FGF-фактор роста фибробластов

FUTP- фтороуридина трифосфат

FU-фторурацил

HeLa-клеточная линия рака шейки матки

HIF-фактор транскрипции, индуцируемый гипоксией

IFN-интерферон

Ig-иммуноглобулин

IL-интерлейкин

iMC-незрелые моноциты

In situ-локально

In vitro-в пробирке

In vivo-в живом организме

iNOS-синтаза оксида азота

JAK-тирозинкиназа человека

K-Ras- протоонкоген, представитель семейства белков Ras

LCP – легкая степень метастатического поражения органа

HCP – тяжелая степень метастатического поражения органа

LD-летальная доза

LLC-эпидермоидная карцинома легкого Льюис

MAPK-митоген-активируемая белковая киназа

MDSC-миелоидные супрессорные клетки

MMP-металлопротеиназа

NET-нейтрофильные внеклеточные ловушки

NK-натуральные клетки-киллеры

p 53-белок, транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл

p RB-белок ретинобластомы

PD-мембранный белок из семейства иммуноглобулинов, стимулирующий апоптоз клетки

Per os-перорально

PG E2-простагландин E2

PI3-фосфоинозитид-3-киназа

SA-PE- стрептавидин-фикоэритрин

STAT-сигнальный белок, трансдуктор и активатор транскрипции

TAM- клеточное микроокружение опухоли

TAN-нейтрофилы из микроокружения опухоли

TGF-трансформирующий ростовой фактор

Th-T-хелперный лимфоцит

TIL- инфильтрирующие опухоль лимфоциты

TMEN-сеть опухолевого микроокружения

TNF-фактор некроза опухоли

Treg-регуляторный T-лимфоцит

VEGF-фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абакумова Т.В. Неспецифический клеточный иммунитет на разных стадиях рака шейки матки [Текст] / Т. В.Абакумова, И.И. Антонеева // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2012. – № 2. - С.104-110
2. Амиралиев А.М. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению больных раком легкого [Текст] / А.М. Амиралиев, С.Г. Багрова, Л.В. Болотина, А.В. Бойко, Т.Н. Борисова, В.В. Бредер, М.Б. Бычков, В.А. Глушко, В.А. Горбунова, К.И. Колбанов, А.А. Коломейцева, Л.А. Королева, К.К. Лактионов, А.Ф. Маренич, И.А. Мещерякова, З.П. Михина, О.В. Пикин, Б.Е. Полоцкий, Е.В. Реутова, С.А. Тюлядин, А.Х. Трахтенберг, А.В. Черниченко // Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению больных раком легкого. - 2013. - 37 с.
3. Базиков И.А. Сравнительная оценка острой токсичности доксорубина и его нисомальной формы [Текст] / И.А. Базиков, Э.В. Бейер, В.В. Лукинова, А.Н. Мальцев // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2015. - Т.10. - №3. - С.403-406
4. Барсуков Ю.А. Пероральные фторпиримидины в предоперационной химиолучевой терапии больных операбельным раком прямой кишки [Текст] / Ю.А.Барсуков, С.И.Ткачев, А.Г.Малихов, С.С.Гордеев, А.Г.Первошиков, В.А.Алиев, Д.В.Кузьмичев, И.Ш.Татаев, Ж.М.Мадьяров, А.И.Овчинникова, Ю.Ю.Ковалева // Колопроктология. - 2015. - Т.5. - №4. - С.24-30
5. Барчук А.С. Стандарты лечения немелкоклеточного рака легкого [Текст] / А.С.Барчук // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2003. – Т. 14. – № 1. - Р.3-7
6. Бахмутский Н.Г. Мелкоклеточный рак лёгкого. [Текст]/ Н.Г. Бахмутский, В.А. Порханов, В.Н. Бодня, Р.П. Ширяев// Медицинский вестник Юга России. - 2017. - Т. 8. - № 4. - С. 6-13.
7. Бережная Н.М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. Клетки и цитокины — участники воспаления [Текст] / Н.М. Бережная/ Онкология. - 2009. - Т.11. - №1. - С.6-17.
8. Боголюбова А.В. Иммунотерапия опухолей, основанная на блокировке иммунологических контрольных «точек» («чекпойнтов») [Текст] / А.В.Боголюбова, Г.А.Ефимов, М.С. Друцкая, С.А.Недоспасов//Медицинская иммунология. -2015. - Т.17. - №5. - С.395-406
9. Бычков М.Б. Мелкоклеточный рак легкого [Текст] / М.Б. Бычков, Э.Н.Дгебуадзе, С.А. Большакова//Практическая онкология. -2005. - Т. 6. - №4. - С. 213-219.

10. Бычков М.Б. Химиотерапия распространенного немелкоклеточного рака легкого [Текст] / М. Б. Бычков // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2003. – Т. 14. – № 1. - С.8-12
11. Вонский М.С. Канцерогенез, ассоциированный с инфекцией вирусами папилломы человека, его механизмы и возможности иммунотерапии [Текст] / М.С.Вонский, М.Г.Шабаева, А.Л.Рунов, Н.Н.Лебедева, Р.Човдхари, Д.М.Палефский, М.Г.Исагулянц // Биохимия. - 2019. - Т. 84. - № 7. - Р. 995–1015
12. Грибова С.Н. Современные представления об этиологии, патогенезе, методах диагностики и лечения фоновых и предраковых заболеваний шейки матки [Текст] / С. Н.Грибова, Г. И. Хрипунова // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2008. – Т. 4. – № 2.- С.18-23
13. Гуцин И.С. Аллергическое воспаление и его фармакологический контроль/ Рос. ассоц. алергологов и клин. иммунологов (РААКИ). - М.: Фармарус принт. - 1998. - 250 с.
14. Дмитриева О.С. Интерлейкин 1 и интерлейкин 6 как главные медиаторы воспаления при развитии рака [Текст] / О.С. Дмитриева, И.П. Шиловский, М.Р. Хаитов, С.И. Гривенников // Биохимия. – 2016. – Т. 81. – № 2. – С. 166-178.
15. Доброхотова Ю.Э. Применение иммуномодулирующей терапии в комплексе противорецидивной терапии ВПЧ-ассоциированного преинвазивного и микроинвазивного рака шейки матки [Текст] / Ю.Э. Доброхотова, М.Г. Венедиктова, А.Н. Саранцев, К.В. Морозова, А.Е. Зыков, А.Ш. Хасан, Н.П. Панова, Ю.А. Савина, В.А. Суворова, К.Ф.Оруджова // Медицинский совет. – 2017. – № 13 - С.20-24
16. Донюш Е.К. Использование внутривенных иммуноглобулинов в клинической практике [Текст] / Е. К.Донюш // Вопросы современной педиатрии. – 2011. – Т. 10. – № 2. - С.49-62
17. Друцкая М.С. Новые тенденции в антицитокиновой терапии [Текст] / М.С. Друцкая, Г.А. Ефимов, А.А.Круглов, С.А.Недоспасов, Д.С.Шварев // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 8. – № 3 (17). - С.706-710
18. Ершов В.А. Повреждения плоского эпителия шейки матки при папилломавирусной инфекции [Текст] / В.А.Ершов, А.А.Вязовая, О.В.Нарвская, Л.В.Лялина, А.С.Лисянская // Инфекция и иммунитет. - 2013. - Т.3. - №1. - С.79-82
19. Жаринов Г.М. Первый опыт локальной иммунотерапии онкогинекологических больных [Текст] / Г.М. Жаринов, О.Е. Молчанов, М.В. Агафонова, С.Ю. Румянцева // Цитокины и воспаление. -2002. - Т.1. - №2. - С.75
20. Зуева Е.П. Методические указания по доклиническому изучению средств, обладающих способностью ингибировать процесс метастазирования и повышать эффективность ци-

- тостатической терапии злокачественных опухолей [Текст] / Е.П.Зуева, А.М.Козлов, Г.К.Герасимова, Е.Н.Амосова, Т.Г.Разина, В.Е.Гольдберг// Руководство по экспериментальному доклиническому изучению новых фармакологических веществ. - 2-е изд. перераб. и доп. - М.: ОАО "Издательство "Медицина", 2005. - С.674-682
21. Измайлов С.Г. Ксимедон в клинической практике [Текст] / С.Г.Измайлов, С.А.Измайлов - Н.Новгород: НГМА, 2001 - 186 с.
 22. Ипатова О.М. Возможности использования нанолипидной системы с глицерризиновой кислотой ("Фосфоглив") для оптимизации лекарственных препаратов - на примере доксорубицина и будесонида [Текст] /О.М.Ипатова, М.Г.Зыкова, В.Н.Прозоровский, Т.И.Торховская, Т.С.Захарова// Биомедицинская химия. - 2009. - Т. 55. - № 2. - С. 185-194.
 23. Кадагидзе З.Г. Цитокины [Текст] / З.Г.Кадагидзе // Практическая онкология. – 2003. – Т.4. - №3. – С. 131-139.
 24. Капитанова К.С. Перспективы использования наночастиц для репрограммирования опухолевых макрофагов в иммунотерапии злокачественных новообразований [Текст] / К.С. Капитанова, В.А. Науменко, А.С. Гаранина, П.А. Мельников, М.А. Абакумов, И.Б. Алиева // Биохимия. – 2019. – Т. 84. – № 7. – С. 934-952.
 25. Кескинов А.А. Влияние секретируемых опухолью веществ на дендритные клетки при раке [Текст] / А. А.Кескинов, М.Р.Щурин, В.М.Бухман, З.С.Шпрах // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – С. 16. – № 1. - Т.12-23
 26. Кинзирский А.С. Изучение влияния дикарбамина на эффективность цитостатической терапии у мышей с карциномой легких Льюис [Текст] / А. С. Кинзирский, Ю. А. Кинзирская, А. И. Зиновьев // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2010. – № 4 (16). – С. 44–49.
 27. Ключагина Ю.И. Роль рецептора PD1 и его лигандов PDL1 и PDL2 в иммунотерапии опухолей [Текст] / Ю.И. Ключагина, З. А. Соколова, М.А.Барышникова // Онкопедиатрия. – 2017. – Т. 4. – № 1.
 28. Коваленко Л.П. Средство с противоопухолевой, антиметастатической активностью, противовоспалительным и противоаллергенным действием. // Патент РФ №2686672 / Л.П. Коваленко, С.В. Никитин, А.Д.Дурнев, Т.А.Гудашева. – 30.04.2019.
 29. Коваленко Л.П. Влияние 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина на рост карциномы легкого Льюис и выживаемость мышей [Текст] / Л.П. Коваленко, О.С. Кузнецова, А.В. Таллерова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 161. – № 1. – С. 114-118.

30. Коваленко Л.П. Влияние 2-изобутил-4,6- диметил-5-оксипиримидина на рост и метастазирование карциномы легкого lewis у мышей линии С57В1/6 [Текст] / Л.П. Коваленко, С.В. Никитин, А.В. Сорокина, И.А. Мирошкина, Е.А. Иванова, О.С. Кузнецова, К.В. Коржова, А.Д. Дурнев // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2020. – Т.83. - №1. – С. 24-27
31. Коваленко Л.П. Влияние производных 5-оксипиримидина на рост опухоли и содержание интерлейкинов в сыворотке крови самок мышей линии СВА с раком шейки матки (РШМ-5) [Текст] / Л.П. Коваленко, К.В. Коржова, Л.Ф. Зайнуллина, С.В. Никитин, Е.А. Иванова, Р.В.Журиков // Биомедицинская химия. – 2021. – Т. 67. – № 2. – С. 158-161
32. Коваленко Л.П. Противоаллергенная и противовоспалительная активность 5- оксипиримидина (СНК-411 и СНК-578) [Текст] / Л.П. Коваленко, К.В. Коржова, С.В. Никитин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2020. – Т.83 – № 10. – С. 9 – 12
33. Козаченко В.П. Иммунопрофилактика рака шейки матки [Текст] / В.П.Козаченко, Г.З.Чкадуа, К.И.Жордания, Ю.Г.Паяниди // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. – 2009. – № 5.-С.24-27
34. Коржова К.В. Влияние производных 5-оксипиримидина на рост опухоли и продолжительность жизни мышей линии С57В1/6 с эпидермоидной карциномой легких [Текст] / К.В. Коржова, Л.П. Коваленко, Е.А. Иванова, С.В. Никитин, А.Д. Дурнев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т.169. - №2. – С. 226-229
35. Корман Д.Б. Побочные явления при применении цитостатиков и механизмы их развития [Электронный ресурс] / Д.Б. Корман // Противоопухолевые препараты, применяемые для лечения злокачественных опухолей органов пищеварения: механизмы действия и фармакокинетика. - Режим доступа: <http://www.oncology.ru/cathedra/lecture/lec/11.pdf>
36. Костарева О.С. Интерлейкин-17: функциональные и структурные особенности; использование в качестве терапевтической мишени [Текст] / О. С. Костарева, А. Г. Габдулхаков, И. А. Коляденко, М. Б. Гарбер, С. В. Тищенко. // Успехи биологической химии. - 2019. - Т. 59. - С. 393–418
37. Кузнецова О.С. Исследование иммунофармакологических свойств и противоопухолевой активности производного 5-оксипиримидина СНК-411: дисс. ... канд.биол.наук: 14.03.06/ Кузнецова Ольга Сергеевна - М., 2016. - 140 с.

38. Кузнецова О.С. Иммунофармакологические свойства нового производного 5-оксипиримидина СНК-411 [Текст] / О.С. Кузнецова, А.В. Таллерова, С.В. Никитин, Л.П. Коваленко // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78. – № 4. – С. 6-9.
39. Кузнецова О.С. Цитотоксическая активность производного 5-оксипиримидина (СНК-411) в отношении опухолевых клеток К-562 [Текст] / О.С. Кузнецова, А.В. Таллерова, А.А.Соколовская, С.В. Никитин, Л.П. Коваленко // Вестник Воронежского Государственного Университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2015. – № 1. – С. 142-146
40. Кузнецова О.С. Эффекты производного 5-оксипиримидина СНК-411 на цитокиновый профиль в модели карциномы легкого Льюис у мышей [Текст] / О.С. Кузнецова, А.В. Таллерова, С.В. Никитин, Л.П. Коваленко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 160. – № 10. – С. 488-491.
41. Кузубова Н.А. Т2-ассоциированные заболевания: в фокусе коморбидный пациент [Текст] / Н.А. Кузубова, О.Н. Титова // Медицинский Совет. - 2020. - Т.17. - С.57-64.
42. Лазарев А.Ф. Влияние иммунотерапии на клеточное звено иммунитета при раке шейки матки [Текст] / А. Ф.Лазарев, Д. К.Кенбаева, Р.К. Медеубаев, А.Е. Горбатенко, С.З. Танатаров // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2014. – Т. 69. – № 3-4. - С.5-8
43. Лазарев А.Ф. Клеточный иммунитет у больных раком шейки матки в процессе иммунотерапии [Текст] / А. Ф.Лазарев, Д. К.Кенбаева, З. А.Манамбаева // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2012. – Т. 23. – № 3. - С.24-28
44. Лазаренко Л.Н. Изменение цитокинового профиля организма и показателей клеточного иммунитета у больных дисплазией шейки матки, индуцированной папилломавирусами [Текст] /Л.Н.Лазаренко, Н.Ф.Лигирда, Л.И.Воробьева, Г.П.Потебня, О.Н.Демченко, Н.Я.Спивак//Акушерство и гинекология. - 2011. - №8. - С.72-76
45. Лепик К.В. Ингибиторы иммунных контрольных точек в терапии лимфом [Текст] / К.В.Лепик // Клиническая онкогематология. - 2018. - № 11(4). - С.303-312.
46. Малишевская Н.П. Проблемы поиска и клинического применения биомаркеров в дифференциальной диагностике меланомы кожи [Электронный ресурс] / Н.П. Малишевская, А.В. Соколова, Р.М. Демидов // Фундаментальные исследования. – 2014. – Т. 2. – № 7. - С.404-411

47. Манжура Е.П. Цервикальная интраэпителиальная неоплазия (CIN). Современные подходы к диагностике, лечению и реабилитации [Текст] / Е.П. Манжура // Здоровье женщины. – 2016. – № 5. – С. 19-25
48. Манзюк Л.В. Гемцитабин в химиотерапии некоторых солидных опухолей (по материалам конгресса ASCO 2002, Орландо, США) [Электронный ресурс] / Л.В. Манзюк Л.В. // Российский медицинский журнал. - 2003. - №11 . - С.636
49. Мачарадзе Д.Ш. Современные клинические аспекты оценки уровней общего и специфических IgE [Текст] / Д. Ш.Мачарадзе // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2017. – Т. 96. – № 2. - С.121-127
50. Межевитинова Е.А. Предраковые поражения шейки матки тактика ведения [Текст] / Е.А. Межевитинова, П.Р. Абакарова, Ю.Р. Хлебкова// Медицинский совет. – 2016. – № 12. - С.112-118
51. Мелехова Н.Ю. Онкологический потенциал различных патологических состояний шейки матки [Текст] / Н. Ю.Мелехова, А. Н.Иванян, Л. И.Харитоновна, И. А.Бехтерева, О. В.Благодыр, Н. Л.Овсянкина, И. Г.Сухарева // Журнал акушерства и женских болезней. – 2006. – Т. LV. – № 3. - С.61-65
52. Мерабишвили В.М. Статистика рака легкого [Текст] /В.М.Мерабишвили, О.Т. Дятченко // Практическая онкология. - 2000. - № 3. - С. 3-7.
53. Мешкова Р.Я. Руководство по иммунопрофилактике для врачей: учебное пособие [Текст] / Мешкова Р.Я. // Смоленск, 1998
54. Мукерия А.Ф. Эпидемиология и профилактика рака легкого / А. Ф.Мукерия, Д. Г.Заридзе // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2010. – Т. 21. – № 3. - С.3-11
55. Мышкин В.А. Антитоксические свойства производных пиримидина [Электронный ресурс] / В.А. Мышкин, Д.А. Еникеев, Р.К. Игбаев // Фундаментальные исследования. – 2014. – Т. 5. – № 10. - С. 945-950
56. Намазова-Баранова Л.С. Вакцинопрофилактика рака шейки матки: новые клинические данные [Текст] / Л.С. Намазова-Баранова // Педиатрическая фармакология. - 2009. - Т. 6 - № 6. - С.36-40
57. Насонов Е.Л. Интерлейкин 17 – новая мишень для антицитокиновой терапии иммуновоспалительных ревматических заболеваний [Текст] / Е.Л. Насонов, Л.Н. Денисов, М.Л. Станислав // Прогресс в ревматологии в XXI веке. -2013. - №5. - С. 545-552
58. Никитин С.В. Синтез, противоопухолевая и антиметастатическая активность производного 5-оксипиримидина [Текст] / С.В. Никитин, Л.П. Коваленко, А.Г. Ребеко, Р.В. Журиков, Е.А. Иванова, А.Д. Дурнев // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – Т. 53. – № 8. – С. 20-23.

59. Новик В.И. Эпидемиология рака шейки матки, факторы риска, скрининг [Текст] / В.И.Новик // Практическая онкология. - 2002.- Т. 3. - №3. - С.156-165
60. Осипов А.О. Фармакологическая активность производных пиримидина [Текст] / А.О.Осипов, П. П.Пурыгин, А.В.Дубищев, А.А.Осипова // Вестник Самарского государственного университета. – 2011. – № 89. - С.167-172
61. Покуль Л.В. Современные этиопатогенетические аспекты blastom шейки матки [Текст] / Л.В. Покуль // Журнал акушерства и женских болезней. - 2015. - №6. - С.58-67
62. Поляков И.С. Молекулярная патология рака лёгкого: клинические аспекты [Текст] / И.С.Поляков, Е.Н.Имянитов // Сибирский онкологический журнал. – 2013. – № 6 (60). - С.48-55
63. Прилепская В.Н. Вакцинация против ВПЧ-ассоциированных заболеваний и рака шейки матки теоретические и практические аспекты [Текст] / В.Н. Прилепская, М.Д. Зардиашвили, Ю.С. Хлебкова, М.Е. Некрасова // Медицинский совет. – 2016. – № 12. - С.120-125
64. Прилепская В.Н. Новые возможности ранней диагностики и профилактики ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки [Текст] / В.Н.Прилепская, Г.Р. Байрамова, Е.А. Коган, В.Ф. Чернова, А.Н. Окушко // Медицинский совет. – 2015. – № XX - С.72-76
65. Пучко М.С. Современные аспекты ведения больных с неинвазивным раком шейки матки [Текст] / М.С. Пучко // Український науково-медичний молодіжний журнал. – 2011. – № 2. – С. 120-123.
66. Реутова Е.В. Немелкоклеточный рак легкого: перспективы химиотерапии [Текст] / Е.В. Реутова, А.Ф.Маренич // Практическая пульмонология. – 2011. – № 3.-С.3-10
67. Саевец В.В. Особенности многокомпонентного лечения местно-распространенного рака шейки матки с учетом гистологического строения опухоли [Текст] / В. В. Саевец, А. В. Важенин, А. В. Жаров, Л. Ф. Чернова, И. Г. Шимоткина, Т. Н. Губайдуллина, Г. Р. Кравченко // Злокачественные опухоли. - 2015.- №2 - С.40-45
68. Самотруева.М.А. Фармакологическая активность производных пиримидинов. Особенности многокомпонентного лечения местно-распространенного рака шейки матки с учетом гистологического строения опухоли [Текст] / М. А. Самотруева, А. А.Цибизова, А. Л. Ясенявская, А. А.Озеров, И. Н.Тюренков // Астраханский медицинский журнал. – 2015. – Т. 10. – № 1.
69. Сафаев Р.Д. Роль фторпиримидиновых препаратов в онкологической практике. Аналитический обзор [Текст] / Р.Д. Сафаев, В.И. Бабский, В.А. Сукирко, В.Р. Хилько // Oncology. - 2007. - №4 (1). - С. 2–11

70. Середенин С.Б. Производное 5-оксипиримидина, обладающее противоопухолевой активностью. // Патент РФ № 2518889 / С.Б. Середенин, С.В. Никитин, Л.П.Коваленко, А.Д.Дурнев. – 10.06.2014.
71. Сипров А.В. Сравнительная оценка влияния производных пиримидина и 3-гидроксипиридина на показатели антиоксидантной защиты сердца и морфологические проявления кардиотоксичности противоопухолевой химиотерапии в эксперименте [Электронный ресурс] / Сипров А.В., Костина Ю.А.//Современные проблемы науки и образования. - 2014. - № 2
72. Скиданенко-Левина О.В. Цитокиновый профиль цервикальной слизи при различных формах папилломавирусной инфекции [Текст] / О. В. Скиданенко-Левина // Казанский медицинский журнал. – 2014. – Т. 95. – № 5. - С.642-645
73. Сухин В.Р. Метастатическое поражение яичников при раке шейки матки [Текст] / В.Р.Сухин// Онкология. - 2008. - Т.10. - №3 - С.374-376
74. Телетаева Г.М. Цитокины и противоопухолевый иммунитет [Текст] / Г.М.Телетаева // Практическая онкология. - 2007. - Т.8. - № 4. - С.215-216.
75. Тимофеев И.В. Аналоги пиримидина в комбинации с цитокинами – вторая линия терапии быстро прогрессирующего метастатического рака почки [Текст] / И.В.Тимофеев, Л.В.Демидов, Г.Ю.Харкевич // Эффективная фармакотерапия. - 2007. - №16. - С.22-25
76. Тимофеев И.В. Гемцитабин и винорельбин в комбинации с интерлейкином-2 при диссеминированном почечноклеточном раке, резистентном к иммунотерапии [Текст] / И. В.Тимофеев, Г. Ю.Харкевич, Л. В.Демидов // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2007. – Т. 18. – № 1. - С.61-64
77. Трахтенберг А.Х. Рак легкого [Текст] / А. Х.Трахтенберг, К. И.Колбанов // Практическая пульмонология. – 2008. – № 4. - С.3-9
78. Трещалина Е.М. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ [Текст]/ Е.М. Трещалина, О.Р.Жукова, Г.К.Герасимова, Н.В.Андропова, А.М.Гарин // Руководство по экспериментальному доклиническому изучению новых фармакологических веществ. - 2-е изд. перераб. и доп. - М.: ОАО "Издательство "Медицина", 2005. - С.637-651
79. Тупицын Н.Н. Роль рецептора цитокинов gp130 в росте и дифференцировке нормальных и опухолевых гемопоэтических клеток [Текст]/ Н.Н.Тупицын // Гематология и трансфузиология. - 2001. - Т.49 - С.9-14
80. Унанян А.Л. Вопросы патогенеза и терапии заболеваний шейки матки, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией [Текст] / Унанян А.Л., Сидорова И.С., Коссович

- Ю.М., Рзянина Ю.А., Кадырова А.Э.//Акушерство. Гинекология. Репродукция .- 2012-Т.6. -№ 1 - С.27-30
81. Уразова Л.Н. Рак шейки матки и вирусы папилломы: этиопатогенетические аспекты [Текст] / Л.Н.Уразова, И.Г.Видяева // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – № 1. - С.64-71
82. Фрейдлин И.С. Иммунная система у людей пожилого и старческого возраста/ И.Р. Фрейдлин, Ткаченко Б.И., Сидоров П.И., Брин В.Б., Завьялов А.В., Захаров Ю.М., Кураев Г.А., Маляренко Т.Н., Пятин В.Ф.// Физиологические основы здоровья человека. - 2001. - С.52-63
83. Фрейдлин И.С. Паракринные и аутокринные механизмы цитокинов регуляции [Текст]/ И.С.Фрейдлин // Иммунология. - 2001. - №5. - С.4-7
84. Хаитов Р.М. Методические указания по изучению иммунотоксического действия фармакологических средств [Текст] / Р.М. Хаитов, А.Р. Иванова, Т.Б. Мастернак, О.Н. Стеценко, Р.И. Атауллаханов, Б.И. Любимов, Л.П. Коваленко, Л.Ю. Телегин, Т.А. Гуськова, А.В. Никитин, Г.П. Кудрина, Е.В. Арзамасцев // Руководство по экспериментальному доклиническому изучению новых фармакологических веществ. - 2-е изд. перераб. и доп. - М.: ОАО "Издательство "Медицина", 2005. - С.70-86
85. Хаитов Р.М. Методические указания по изучению иммуностропной активности фармакологических веществ [Текст] / Р.М.Хаитов, И.С.Гущин, Б.В.Пинегин, А.И.Зебров// Руководство по экспериментальному доклиническому изучению новых фармакологических веществ. - 2-е изд. перераб. и доп. - М.: ОАО "Издательство "Медицина", 2005. - С.501-514
86. Чуруксаева О.Н. Иммуногистохимические факторы в прогнозе местно-распространенного рака шейки матки [Текст] / О.Н. Чуруксаева, Л.А. Коломиец, О.В. Савенкова, В.В. Недосеков // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2012. – № 3-4. - С.126-132
87. Шабанов П.Д. Адаптогены и антигипоксанты [Текст] / П.Д.Шабанов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2003. – Т. 2. – № 3. - С.50-80
88. Шварц Г.Я. Методические указания по изучению новых нестероидных противовоспалительных препаратов [Текст] / Г.Я. Шварц, Р.Д. Сябаев // Руководство по экспериментальному доклиническому изучению новых фармакологических веществ. - 2-е изд. перераб. и доп. - М.: ОАО "Издательство "Медицина", 2005. - С.695-709
89. Шуйкова.К.В. Кардиотоксичность современных химиотерапевтических препаратов / К. В.Шуйкова, Е.И. Емелина, Г.Е. Гендлин, Г.И. Сторожаков // Атмосфера. Новости кардиологии. – 2012. – № 3. - С.9-19

90. Adris S. IL-10 expression by CT26 colon carcinoma cells inhibits their malignant phenotype and induces a T cell-mediated tumor rejection in the context of a systemic Th2 response [Text] / S. Adris, S. Klein, M. Jasnis, E. Chuluyan, M. Ledda, A. Bravo, C. Carbone, Y. Chernajovsky, O. Podhajcer // *Gene Therapy*. – 1999. – Vol. 6. – № 10. – P. 1705-1712.
91. Ahmed Kamal . Synthesis of pyrazolo[1,5-a]pyrimidine linked aminobenzothiazole conjugates as potential anticancer agents [Text] / Ahmed Kamal, Jaki R. Tamboli , V. Lakshma Nayak, S. F. Adil, M. V. P. S. Vishnuvardhan, S. Ramakrishna // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. - 2013. - 23. - P. 3208–3215
92. Aktipis C.A. Life history trade-offs in cancer evolution [Text] / C.A. Aktipis, A.M. Boddy, R.A. Gatenby, J.S. Brown, C.C. Maley // *Nature reviews. Cancer*. – 2013. – Vol. 13. – № 12. – P. 883-892.
93. Ansel K.M. Regulation of Th2 differentiation and IL4 locus accessibility [Text] / K.M. Ansel, I. Djuretic, B. Tanasa, A. Rao // *Annual Review of Immunology*. – 2006. – Vol. 24. – P. 607-656.
94. Asadullah K. Interleukin-10 therapy--review of a new approach [Text] / K. Asadullah, W. Sterry, H.D. Volk // *Pharmacological Reviews*. – 2003. – Vol. 55. – № 2. – P. 241-269.
95. Bankaitis K.V. Targeting IL4/IL4R for the treatment of epithelial cancer metastasis [Text] / K.V. Bankaitis, B. Fingleton // *Clinical & experimental metastasis*. – 2015. – Vol. 32. – № 8. – P. 847-856.
96. Batool H. Al-Ghurabi. IL-2 and IL-4 serum levels in breast cancer [Text] / Batool H. Al-Ghurabi // *Fac Med Baghdad*. - 2009. - Vol. 51. - №3. - P.300-303
97. Becker C. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling [Text] / C. Becker, M.C. Fantini, C. Schramm, H.A. Lehr, S. Wirtz, A. Nikolaev, J. Burg, S. Strand, R. Kiesslich, S. Huber, H. Ito, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, P.R. Galle, M. Blessing, S. Rose-John, M.F. Neurath // *Immunity*. – 2004. – Vol. 21. – № 4. – P. 491-501.
98. Beekman R. Jak/Stat signaling: IL-6 receptor family [Text] / R. Beekman, M.F.Neurath, S.Finotto, P.Sansone, J.Bromberg, W.Vainchenker, S.N.Constantinescu, H.Yu, D.Pardoll, R.Jove//*CST Guide: pathways and protocols*.-2015. – P.181.
99. Biswas S.K. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm [Text] / S.K. Biswas, A. Mantovani // *Nature Immunology*. – 2010. – Vol. 11. – № 10. – P. 889-896.
100. Bremnes R.M. The Role of tumor-infiltrating lymphocytes in development, progression, and prognosis of non–small cell lung cancer [Text] / R.M. Bremnes, L.-T. Busund, T.L. Kilvær, S.

Andersen, E. Richardsen, E.E. Paulsen, S. Hald, M.R. Khanekhenari, W.A. Cooper, S.C. Kao, T. Dønnem // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2016. – Vol. 11. – № 6. – P. 789-800.

101. Carbone D.P. Non–small cell lung cancer: role of the immune system and potential for immunotherapy [Text] / D.P. Carbone, D.R. Gandara, S.J. Antonia, C. Zielinski, L. Paz-Ares // *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. – 2015. – Vol. 10. –№ 7. – P. 974-984.
102. Cassatella M.A. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide [Text] / M.A. Cassatella, L. Meda, S. Bonora, M. Ceska, G. Constantin // *The Journal of Experimental Medicine*. – 1993. – Vol. 178. – № 6. – P. 2207-2211.
103. Chang S.H. T helper 17 (Th17) cells and interleukin-17 (IL-17) in cancer [Text] / S.H. Chang // *Archives of Pharmacal Research*. – 2019. – Vol. 42. – № 7. – P. 549-559.
104. Chen Z.F. CD4+CD25+Foxp3+ Treg and TGF-beta play important roles in pathogenesis of Uygur cervical carcinoma [Text] / Z.F. Chen, Q. Xu, J.B. Ding, Y. Zhang, R. Du, Y. Ding // *European Journal of Gynaecological Oncology*. – 2012. – Vol. 33. – № 5. – P. 502-507.
105. Christofi T. Current Perspectives in Cancer Immunotherapy [Text] / T. Christofi, S. Baritaki, L. Falzone, M. Libra, A. Zaravinos. // *Cancers*. - 2019. - Vol. 11. - P.1472
106. Cools-Lartigue J. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis [Text] / J. Cools-Lartigue, J. Spicer, B. McDonald, S. Gowing, S. Chow, B. Gianias, F. Bourdeau, P. Kubes, L. Ferri // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2013. – Vol. 123. – № 8. – P. 3446-3458.
107. Corinti S. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions [Text] / S. Corinti, C. Albanesi, A. la Sala, S. Pastore, G. Girolomoni // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. – 2001. – Vol. 166. – № 7. – P. 4312-4318.
108. Cottrez F. Regulation of TGF-beta response during T cell activation is modulated by IL-10 [Text] / F. Cottrez, H. Groux // *Journal of Immunology*. – 2001. – Vol. 167. – № 2. – P. 773-778.

109. Cui X. Analysis of CD137L and IL-17 expression in tumor tissue as prognostic indicators for glioblastoma [Text] / X. Cui, Z. Xu, Z. Zhao, D. Sui, X. Ren, Q. Huang, J. Qin, L. Hao, Z. Wang, L. Shen, S. Lin // *International Journal of Biological Sciences*. – 2013. – Vol. 9. – № 2. – P. 134-141.
110. Cutler S.J. Novel STAT binding elements mediate IL-6 regulation of MMP-1 and MMP-3 [Text] / Samuel J. Cutler, James D. Doecke, Ibtisam Ghazawi, Jinbo Yang, Lyn R. Griffiths, Kevin J. Spring, Stephen J. Ralph, Albert S. Mellick // *Scientific Reports*. - 2017. - Vol. 7. - № 8526. -P.1-12
111. Dace D.S. Interleukin-10 promotes pathological angiogenesis by regulating macrophage response to hypoxia during development [Electronic resource] / D.S. Dace, A.A. Khan, J. Kelly, R.S. Apte // *PloS One*. – 2008. – Vol. 3. – № 10. – P. e3381.
112. Decker T. Jaks, Stats and the immune system [Text] / T. Decker, A. Meinke // *Immunobiology*. – 1997. – Vol. 198. – № 1-3. – P. 99-111.
113. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy [Text] / G. Dranoff // *Nature Reviews. Cancer*. – 2004. – Vol. 4. – № 1. – P. 11-22.
114. Dunn G.P. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumour escape [Text] / G.P. Dunn, A.T. Bruce, H. Ikeda, L.J. Old, R.D. Schreiber // *Nat Immunol*. – 2002. – №3. – P.991–998
115. Eiró N. Relationship between the inflammatory molecular profile of breast carcinomas and distant metastasis development [Electronic resource] / N. Eiró, L. González, L.O. González, B. Fernandez-Garcia, M.L. Lamelas, L. Marín, S. González-Reyes, J.M. del Casar, F.J. Vizoso // *PloS One*. – 2012. – Vol. 7. – № 11. – P. e49047.
116. Emmerich J. IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8+ T cells without de novo infiltration from secondary lymphoid organs [Text] / J. Emmerich, J.B. Mumm, I.H. Chan, D. LaFace, H. Truong, T. McClanahan, D.M. Gorman, M. Oft // *Cancer Research*. – 2012. – Vol. 72. – № 14. – P. 3570-3581.
117. Endo T. Comparison of the regulations by Th2-type cytokines of the arachidonic-acid metabolic pathway in human alveolar macrophages and monocytes [Text] / T. Endo, F. Ogushi, T. Kawano, S. Sone // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 1998. – Vol. 19. – № 2. – P. 300-307.
118. Enk A.H. Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10 [Text] / A.H. Enk, S.I. Katz // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. – 1992. – Vol. 149. – № 1. – P. 92-95.
119. Eruslanov E.B. Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer [Text] / E.B. Eruslanov, P.S. Bhojnagarwala, J.G. Quatromoni, T.L. Stephen, A. Ranganathan, C. Deshpande, T. Akimova, A. Vachani, L. Litzky, W.W. Hancock, J.R. Conejo-

- Garcia, M. Feldman, S.M. Albelda, S. Singhal // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2014. – Vol. 124. – № 12. – P. 5466-5480.
120. Fabre J. Targeting the tumor microenvironment: the protumor effects of IL-17 related to cancer type [Text] / J. Fabre, J. Giustiniani, C. Garbar, F. Antonicelli, Y. Merrouche, A. Bensussan, M. Bagot, R. al-Dacak // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2016. – Vol. 17.– № 9. – P.1-13
121. Fiorentino D.F. Two types of mouse T helper cells. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones [Text] / D.F. Fiorentino, M.W. Bond, T.R. Mosmann // *The Journal of Experimental Medicine*. – 1989. – Vol. 170. – № 6. – P. 2081-2095.
122. Gaffen S.L. Structure and signaling in the IL-17 receptor family [Text] / S.L. Gaffen // *Nature Reviews. Immunology*. – 2009. – Vol. 9. – № 8. – P. 556-567.
123. Galdiero M.R. Cancer inflammation and cytokines [Electronic resource] / M.R. Galdiero, G. Marone, A. Mantovani // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2018. – Vol. 10. – № 8. – P. a028662.
124. García-Hernández M.L. Interleukin-10 promotes B16-melanoma growth by inhibition of macrophage functions and induction of tumour and vascular cell proliferation [Text] / M.L. García-Hernández, R. Hernández-Pando, P. Gariglio, J. Berumen // *Immunology*. – 2002. – Vol. 105. – № 2. – P. 231-243.
125. Garcia-Sanz D.M. Morphological characterization of Lewis lung carcinoma (3LL). A Light and Electron Microscopic Study [Text] / D.M. Garcia-Sanz, R. Simón-Marín, E. Hilario // *Tumori Journal*. – 2018. – №75. – P.21-27
126. Gardiner R.E. Low immunogenicity in non-small cell lung cancer; do new developments and novel treatments have a role? [Text] / R.E. Gardiner, S. Jahangeer, P. Forde, A.B. Ariffin, B. Bird, D. Soden, J. Hinchion // *Cancer Metastasis Reviews*. – 2015. – Vol. 34. – № 1. – P. 129-144.
127. Gérard C.M. Loss of tumorigenicity and increased immunogenicity induced by interleukin-10 gene transfer in B16 melanoma cells [Text] / C.M. Gérard, C. Bruyns, A. Delvaux, N. Baudson, J.L. Dargent, M. Goldman, T. Velu // *Human Gene Therapy*. – 1996. – Vol. 7. – № 1. – P. 23-31.
128. Germano G. Cytokines as a key component of cancer-related inflammation [Text] / G. Germano, P. Allavena, A. Mantovani // *Cytokine*. – 2008. – Vol. 43. – № 3. – P. 374-379.
129. Gillies R.J. Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy doesn't work [Text] / R.J.Gillies, D.Verduzco, R.A.Gatenby // *Nature reviews.Cancer*. – 2012. – Vol.12. – P.487-493

130. Goodman G.E. Treatment of small cell lung cancer with VP-16, vincristine, doxorubicin (Adriamycin), cyclophosphamide (EVAC), and high-dose chest radiotherapy [Text] / G.E. Goodman, T.P. Miller, M.M. Manning, S.L. Davis, L.J. McMahon // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 1983. – Vol. 1. – № 8. – P. 483-488.
131. Gorbacheva R.M. Immune checkpoint inhibitors in the treatment of lymphomas [Text] / R.M. Gorbacheva, I.P. Pavlov // *Clinical Oncohematology*. – 2018. – Vol. 11. – № 4. – P. 303-312.
132. Grivennikov S.I. Immunity, Inflammation, and Cancer [Text] / S.I. Grivennikov, R. Greten Florian, M. Karin // *Cell*. - 2010. - Vol. 140. - № 6. - P. 883-899
133. Gu F.-M. Intratumoral IL-17⁺ cells and neutrophils show strong prognostic significance in intrahepatic cholangiocarcinoma [Text] / F.-M. Gu, Q. Gao, G.-M. Shi, X. Zhang, J. Wang, J.-H. Jiang, X.-Y. Wang, Y.-H. Shi, Z.-B. Ding, J. Fan, J. Zhou // *Annals of Surgical Oncology*. – 2012. – Vol. 19. – № 8. – P. 2506-2514.
134. Guéry L. Th17 Cell plasticity and functions in cancer immunity [Text] / Leslie Guéry, Stéphanie Hugues // *BioMed Research International*. -2015. - Vol. 2015. - P.1-11
135. Hagemann T. Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype [Text] / T. Hagemann, J. Wilson, F. Burke, H. Kulbe, N.F. Li, A. Plüddemann, K. Charles, S. Gordon, F.R. Balkwill // *The Journal of Immunology*. – 2006. – Vol. 176. – № 8. – P. 5023-5032.
136. Hassuneh M.R. Role of interleukin-10 in the regulation of tumorigenicity of a T cell lymphoma [Text] / M.R. Hassuneh, M. Nagarkatti, P.S. Nagarkatti // *Leukemia & lymphoma*. – 2013. – Vol. 54. – № 4. – P. 827-834.
137. Hausen H. zur. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis [Text] / H. zur Hausen // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2000. – Vol. 92. – № 9. – P. 690-698.
138. He D. IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor-promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells [Text] / He D., Li H., Yusuf N., Elmets C.A., Li J., Mountz J.D., Xu H. // *J. Immunol.* - 2010. - № 184 (5). - P. 2281–2288.
139. Hernan R. IL-4 induces proliferation in prostate cancer PC3 cells under nutrient-depletion stress through the activation of the JNK pathway and survivin upregulation [Text] / Hernan R., Matthew J. Craig, Chi Ying, Zachary S. Varsos, Paul Czarnieski, Ajjai S. Alva, James Hernandez, David Fuller, Stephanie Daignault, Patrick N. Healy, and Kenneth J. Pienta. // *J Cell Biochem.*- 2012. - № 113(5).- P. 1569–1580

140. Hernando-Cubero J. The role of fluoropyrimidines in gastrointestinal tumours: from the bench to the bed [Text] / J. Hernando-Cubero, I. Matos-García, V. Alonso-Orduña, J. Capdevila // *Journal of Gastrointestinal Cancer*. – 2017. – Vol. 48. – The Role of Fluoropyrimidines in Gastrointestinal Tumours. – № 2. – P. 135-147.
141. Hirano T. The biology of interleukin-6 [Text] / T. Hirano // *Chemical Immunology*. – 1992. – Vol. 51. – P. 153-180.
142. Hughes T.V. A novel 5-[1,3,4-oxadiazol-2-yl]-N-aryl-4,6-pyrimidine diamine having dual EGFR/HER2 kinase activity: design, synthesis, and biological activity [Text] / T.V. Hughes, G. Xu, S.K. Wetter, P.J. Connolly, S.L. Emanuel, P. Karnachi, S.R. Pollack, N. Pandey, M. Adams, S. Moreno-Mazza, S.A. Middleton, L.M. Greenberger // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2008. – Vol. 18. – № 17. – P. 4896-4899.
143. Hui-Chou H.G. Short-term application of doxorubicin chemotherapy immunosuppressive side effects for composite tissue allotransplantation [Text] / H.G. Hui-Chou, J.B. Olenczak, C.B. Drachenberg, S.M. Shea, E.D. Rodriguez // *Annals of Plastic Surgery*. – 2012. – Vol. 68. – № 2. – P. 215-221.
144. Ibrahim D.A. Design, synthesis and biological study of novel pyrido[2,3-d]pyrimidine as anti-proliferative CDK2 inhibitors [Text] / D.A. Ibrahim, N.S.M. Ismail // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2011. – Vol. 46. – № 12. – P. 5825-5832.
145. Inoue Y. Novel regulatory mechanisms of CD40-induced prostanoid synthesis by IL-4 and IL-10 in Human Monocytes [Text] / Y. Inoue, T. Otsuka, H. Niuro, S. Nagano, Y. Arinobu, E. Ogami, M. Akahoshi, K. Miyake, I. Ninomiya, S. Shimizu, H. Nakashima, M. Harada // *The Journal of Immunology*. – 2004. – Vol. 172. – № 4. – P. 2147-2154.
146. Ishihara K. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease [Text] / K. Ishihara, T. Hirano // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. – 2002. – Vol. 13. – № 4-5. – P. 357-368.
147. Iwakura Y. Functional specialization of interleukin-17 family members [Text] / Y. Iwakura, H. Ishigame, S. Saijo, S. Nakae // *Immunity*. – 2011. – Vol. 34. – № 2. – P. 149-162.
148. Jackute J. Distribution of M1 and M2 macrophages in tumor islets and stroma in relation to prognosis of non-small cell lung cancer [Text] / J. Jackute, M. Zemaitis, D. Pranys, B. Sitkauskiene, S. Miliauskas, S. Vaitkiene, R. Sakalauskas // *BMC Immunology*. – 2018. – Vol. 19. – №3. – P.1-13
149. Jang H.-J. Synthesis of thienopyrimidine derivatives as inhibitors of STAT3 Activation Induced by IL-6 [Text] / H.-J. Jang, S.M. Kim, M.-C. Rho, S.W. Lee, Y.-H. Song // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2019. – Vol. 29. – № 6. – P. 856-862.

150. Jenkins J.K. The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils [Text] / Jenkins J.K., Malyak M., Arend W.P. // *Lymphokine and Cytokine Research*. – 1994. – Vol. 13. – № 1. – P. 47-54.
151. Jensen S.A. Risk factors and prevention of cardiotoxicity induced by 5-fluorouracil or capecitabine [Text] / S.A. Jensen, J.B. Sørensen // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. – 2006. – Vol. 58. – № 4. – P. 487-493.
152. Jensen-Jarolim E. The nascent field of Allergooncology [Text] / E. Jensen-Jarolim, G.Pawelec // *Cancer Immunology and Immunotherapy*. - 2012. - Vol.61 - №9. - P.1355-1357
153. Jin Y. Interleukin-10 deficiency aggravates kidney inflammation and fibrosis in the unilateral ureteral obstruction mouse model [Text] / Y. Jin, R. Liu, J. Xie, H. Xiong, J.C. He, N. Chen // *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. – 2013. – Vol. 93. – № 7. – P. 801-811.
154. Joerger M. The IL-17-Th1/Th17 pathway: an attractive target for lung cancer therapy? [Text] / M. Joerger, S.P. Finn, S. Cuffe, A.T. Byrne, S.G. Gray // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. – 2016. – Vol. 20. – № 11. – P. 1339-1356.
155. Kacha A.K. Spontaneous rejection of poorly immunogenic P1.HTR tumors by Stat6-deficient mice [Text] / A.K. Kacha, F. Fallarino, M.A. Markiewicz, T.F. Gajewski // *The Journal of Immunology*. – 2000. – Vol. 165. – № 11. – P. 6024-6028.
156. Karim A.F. The association between allergic diseases and cancer. A systematic review of literature [Text] / A.F.Karim, L.E.H.Westenberg, L.E.M.Eurelings, R.Otten, R.Gerth van Wijk // *The Netherlands Journal of Medicine*. - 2019. - Vol.77 - №2. - P.42-66.
157. Kataki A. Tumor-infiltrating lymphocytes and macrophages have a potential dual role in lung cancer by supporting both host-defense and tumor progression [Text] / A. Kataki, P. Scheid, M. Piet, B. Marie, N. Martinet, Y. Martinet, J.-M. Vignaud // *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. – 2002. – Vol. 140. – № 5. – P. 320-328.
158. Kawakami K. Overexpressed cell surface interleukin-4 receptor molecules can be successfully targeted for antitumor cytotoxic therapy [Text] / K. Kawakami, M. Kawakami, R.K. Puri // *Critical Reviews in Immunology*. – 2001. – Vol. 21. – № 1-3. – P. 299-310.
159. Kellar A. Preclinical murine models for lung cancer: clinical trial applications [Text] / Kellar A., C. Egan, D. Morris/ *BioMed Research International*. - 2015. - №2015.
160. Kelly R.J. Immunotherapy for non-small cell lung cancer [Text] / R.J. Kelly, J.L. Gulley, G. Giaccone // *Clinical lung cancer*. – 2010. – Vol. 11. – № 4. – P. 228-237.

161. Kemp M.M. A novel HDAC inhibitor with a hydroxy-pyrimidine scaffold [Text] / M.M. Kemp, Q. Wang, J.H. Fuller, N. West, N.M. Martinez, E.M. Morse, M. Weïwer, S.L. Schreiber, J.E. Bradner, A.N. Koehler // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2011. – Vol. 21. – № 14. – P. 4164-4169.
162. Kim B.G. Inhibition of interleukin-10 (IL-10) production from MOPC 315 tumor cells by IL-10 antisense oligodeoxynucleotides enhances cell-mediated immune responses [Text] / Kim B.G., Joo H.G., Chung I.S., Chung H.Y., Woo H.J., Yun Y.S.// *Cancer Immunol. Immunother.* - 2000.- № 49 (8). -P. 433–440.
163. Kobayashi M. A pathogenic role of Th2 cells and their cytokine products on the pulmonary metastasis of murine B16 melanoma [Text] / M. Kobayashi, H. Kobayashi, R.B. Pollard, F. Suzuki // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. – 1998. – Vol. 160. – № 12. – P. 5869-5873.
164. Kossakowska A.E. Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas [Text] / A.E. Kossakowska, D.R. Edwards, C. Prusinkiewicz, M.C. Zhang, D. Guo, S.J. Urbanski, T. Grogan, L.A. Marquez, A. Janowska-Wieczorek // *Blood*. – 1999. – Vol. 94. – № 6. – P. 2080-2089.
165. Kothari P. IL-6-mediated induction of MMP-9 is modulated by JAK-dependent IL-10 expression in macrophages [Text] / P. Kothari, R. Pestana, R. Mesraoua, R. Elchaki, K.M. Faisal Khan, Andrew J. Dannenberg, and Domenick J. Falcone/ *J Immunol.* - 2014. - №192(1)
166. Kottke T. Detecting and targeting tumor relapse by its resistance to innate effectors at early recurrence [Text] / T. Kottke, N. Boisgerault, R.M. Diaz, O. Donnelly, D. Rommelfanger-Konkol, J. Pulido, J. Thompson, D. Mukhopadhyay, R. Kaspar, M. Coffey, H. Pandha, A. Melcher, K. Harrington, P. Selby, R. Vile // *Nature Medicine*. – 2013. – Vol. 19. – № 12. – P. 1625-1631.
167. Krejsgaard T. Elucidating the role of interleukin-17F in cutaneous T-cell lymphoma [Text] / T. Krejsgaard, I.V. Litvinov, Y. Wang, L. Xia, A. Willerslev-Olsen, S.B. Korolov, K.L. Kopp, C.M. Bonfeld, M.A. Wasik, C. Geisler, A. Woetmann, Y. Zhou, D. Sasseville, N. Odum // *Blood*. – 2013. – Vol. 122. – № 6. – P. 943-950.
168. Kundu N. Interleukin-10 gene transfer inhibits murine mammary tumors and elevates nitric oxide [Text] / N. Kundu, R. Dorsey, M.J. Jackson, P. Guitierrez, K. Wilson, S. Fu, K. Ramanujam, E. Thomas, A.M. Fulton // *International Journal of Cancer*. – 1998. – Vol. 76. – № 5. – P. 713-719.

169. Kundu N. Interleukin-10 inhibits tumor metastasis, downregulates MHC class I, and enhances NK lysis [Text] / N. Kundu, A.M. Fulton // *Cellular Immunology*. – 1997. – Vol. 180. – № 1. – P. 55-61.
170. Lan C. High density of IL-17-producing cells is associated with improved prognosis for advanced epithelial ovarian cancer [Text] / C.Lan, X.Huang, S.Lin, H.Huang, Q.Cai, J.Lu, J.Liu // *Cell and Tissue Research*. - 2013. - № 352(2). - P.351-359.
171. Laufer S.A. From imidazoles to pyrimidines: new inhibitors of cytokine release [Text] / S.A. Laufer, G.K. Wagner // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2002. – Vol. 45. – From Imidazoles to Pyrimidines. – № 13. – P. 2733-2740.
172. Li J. Clinical significance of serum T helper 1/T helper 2 cytokine shift in patients with non-small cell lung cancer [Text] / J. Li, Z. Wang, K. Mao, X. Guo // *Oncology Letters*. – 2014. – Vol. 8. – № 4. – P. 1682-1686.
173. Li J. Interleukin 17A promotes hepatocellular carcinoma metastasis via NF- κ B induced matrix metalloproteinases 2 and 9 expression [Electronic resource] / J. Li, G.K.-K. Lau, L. Chen, S. Dong, H.-Y. Lan, X.-R. Huang, Y. Li, J.M. Luk, Y.-F. Yuan, X. Guan // *PloS One*. – 2011. – Vol. 6. – № 7. – P. e21816.
174. Li Z. Endogenous Interleukin-4 promotes tumor development by increasing tumor cell resistance to apoptosis [Text] / Z. Li, J. Jiang, Z. Wang, J. Zhang, M. Xiao, C. Wang, Y. Lu, Z. Qin // *Cancer Research*. – 2008. – Vol. 68. – № 21. – P. 8687-8694.
175. Li Z. Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity [Text] / Z. Li, L. Chen, Z. Qin // *Cellular and Molecular Immunology*. – 2009. – Vol. 6. – № 6. – P. 415-422.
176. Lin T.J. Differential regulation of mast cell function by IL-10 and stem cell factor [Text] / T.J. Lin, A.D. Befus // *Journal of Immunology*. – 1997. – Vol. 159. – № 8. – P. 4015-4023.
177. Liu J. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma [Text] / J. Liu, Y. Duan, X. Cheng, X. Chen, W. Xie, H. Long, Z. Lin, B. Zhu // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2011. – Vol. 407. – № 2. – P. 348-354.
178. Löffler M. Pyrimidine pathways in health and disease [Text] / M. Löffler, L.D. Fairbanks, E. Zameitat, A.M. Marinaki, H.A. Simmonds // *Trends in Molecular Medicine*. – 2005. – Vol. 11. – № 9. – P. 430-437.
179. Lv L. The accumulation and prognosis value of tumor-infiltrating IL-17 producing cells in esophageal squamous cell carcinoma [Electronic resource] / L. Lv, K. Pan, X. Li, K. She, J.

- Zhao, W. Wang, J. Chen, Y. Chen, J. Yun, J. Xia // *PloS One*. – 2011. – Vol. 6. – № 3. – P. e18219.
180. Maeda H. Analyses of repeated failures in cancer therapy for solid tumors: poor tumor-selective drug delivery, low therapeutic efficacy and unsustainable costs [Text] / H. Maeda, M. Khatami. // *Clinical and translational medicine*. - 2018. - Vol. 7. - №1. - P. 11.
181. Ma J. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time [Text] / J. Ma, L. Liu, G. Che, N. Yu, F. Dai, Z. You // *BMC cancer*. – 2010. – Vol. 10. – P. 112.
182. Malefyt de Waal. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes [Text] / Malefyt de Waal R., Abrams J., Bennett B., Figdor C.G., de Vries J.E. // *The Journal of Experimental Medicine*. – 1991. – Vol. 174. – № 5. – P. 1209-1220.
183. Mantovani A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes [Text] / A. Mantovani, S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena, A. Sica // *Trends in Immunology*. – 2002. – Vol. 23. – Macrophage polarization. – № 11. – P. 549-555.
184. Mantovani A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity [Text] / A. Mantovani, A. Sica // *Current Opinion in Immunology*. – 2010. – Vol. 22. – Macrophages, innate immunity and cancer. – № 2. – P. 231-237.
185. Martinez F.O. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective [Text] / F.O. Martinez, L. Helming, S. Gordon // *Annual Review of Immunology*. – 2009. – Vol. 27. – Alternative activation of macrophages. – P. 451-483.
186. Martinez F.O. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment [Text] / F.O. Martinez, S. Gordon // *F1000Prime Reports*. – 2014. – Vol. 6.
187. Matsumoto K. Interleukin-4 cooperates with interleukin-10 to inhibit vascular permeability factor release by peripheral blood mononuclear cells from patients with minimal-change nephrotic syndrome [Text] / K. Matsumoto, H. Ohi, K. Kanmatsuse // *American Journal of Nephrology*. – 1999. – Vol. 19. – № 1. – P. 21-27.
188. May K.F. Immunosurveillance: innate and adaptive antitumor immunity. *Cancer immunotherapy* [Text] / K.F. May, M. Jinushi, G. Dranoff // *Cancer Immunotherapy*. - Elsevier Inc. Chapters, 2013. – 37 p.

189. Medrek C. The presence of tumor-associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients [Text] / C. Medrek, F. Pontén, K. Jirström, K. Leandersson // *BMC cancer*. – 2012. – Vol. 12. – P. 306.
190. Mellman I. Cancer immunotherapy comes of age [Text] / I. Mellman, G. Coukos, G. Dranoff // *Nature*. – 2011. – Vol. 480. – № 7378. – P. 480-489.
191. Miossec P. Targeting IL-17 and T H 17 cells in chronic inflammation [Text] / P. Miossec, J.K. Kolls // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2012. – Vol. 11. – № 10. – P. 763-776.
192. Mocellin S. IL-10 stimulatory effects on human NK cells explored by gene profile analysis [Text] / S. Mocellin, M. Panelli, E. Wang, C.R. Rossi, P. Pilati, D. Nitti, M. Lise, F.M. Marincola // *Genes & Immunity*. – 2004. – Vol. 5. – № 8. – P. 621-630.
193. Mocellin S. The dual role of IL-10 [Text] / S. Mocellin, M.C. Panelli, E. Wang, D. Nagorsen, F.M. Marincola // *Trends in Immunology*. – 2003. – Vol. 24. – № 1. – P. 36-43.
194. Moore K.W. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRFI [Text] / K.W. Moore, P. Vieira, D.F. Fiorentino, M.L. Trounstein, T.A. Khan, T.R. Mosmann // *Science (New York)*. – 1990. – Vol. 248. – № 4960. – P. 1230-1234.
195. Mosser D.M. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine [Text] / D.M. Mosser, X. Zhang // *Immunological reviews*. – 2008. – Vol. 226. – Interleukin-10. – P. 205-218.
196. Mountain C.F. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer [Text] / C.F. Mountain // *Chest*. – 1997. – Vol. 111. – № 6. – P. 1710-1717.
197. Murdoch C. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues [Text] / C. Murdoch, A. Giannoudis, C.E. Lewis // *Blood*. – 2004. – Vol. 104. – № 8. – P. 2224-2234.
198. Nagai S. Interleukin-4 and breast cancer [Text] / S. Nagai, M. Toi // *Breast Cancer*. – 2000. – Vol. 7. – № 3. – P. 181-186.
199. Nagata T. Overexpression of pyrimidine nucleoside phosphorylase enhances the sensitivity to 5'-deoxy-5-fluorouridine in tumour cells in vitro and in vivo [Text] / T. Nagata, M. Nakamori, M. Iwahashi, H. Yamaue // *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*. – 2002. – Vol. 38. – № 5. – P. 712-717.
200. Nakajima H. Constitutive production of IL-4 and IL-10 and stimulated production of IL-8 by normal peripheral blood eosinophils [Text] / H. Nakajima, G.J. Gleich, H. Kita // *Journal of Immunology*. – 1996. – Vol. 156. – № 12. – P. 4859-4866.
201. Niiro H. Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils [Text] / H. Niiro, T. Otsuka, K. Izuhara, K. Yamaoka, K. Ohshima, T. Tanabe, S. Hara, Y. Nemoto, Y. Tanaka, H. Nakashima, Y. Niho // *Blood*. – 1997. – Vol. 89. – № 5. – P. 1621-1628.

202. Nishio H. Immunosuppression through constitutively activated NF- κ B signaling in human ovarian cancer and its reversal by an NF- κ B inhibitor [Text] / H. Nishio, T. Yaguchi, J. Sugiyama, H. Sumimoto, K. Umezawa, T. Iwata, N. Susumu, T. Fujii, N. Kawamura, A. Kobayashi, J. Park, D. Aoki, Y. Kawakami // *British Journal of Cancer*. – 2014. – Vol. 110. – № 12. – P. 2965-2974.
203. Noy R. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy [Text] / R. Noy, J.W. Pollard // *Immunity*. – 2014. – Vol. 41. – № 1. – P. 49-61.
204. O'Callaghan D.S. The role of inflammation in the pathogenesis of non-small cell lung cancer [Text] / D.S. O'Callaghan, D. O'Donnell, F. O'Connell, K.J. O'Byrne // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2010. – Vol. 5. – № 12. – P. 2024-2036.
205. Onishi R.M. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease [Text] / R.M. Onishi, S.L. Gaffen // *Immunology*. – 2010. – Vol. 129. – № 3. – P. 311-321.
206. Pan B. Interleukin-17 levels correlate with poor prognosis and vascular endothelial growth factor concentration in the serum of patients with non-small cell lung cancer [Text] / B. Pan, D. Che, J. Cao, J. Shen, S. Jin, Y. Zhou, F. Liu, K. Gu, Y. Man, L. Shang, Y. Yu // *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*. – 2015. – Vol. 20. – № 4. – P. 232-239.
207. Pan B. Interleukin-17 promotes angiogenesis by stimulating VEGF production of cancer cells via the STAT3/GIV signaling pathway in non-small-cell lung cancer [Text] / B. Pan, J. Shen, J. Cao, Y. Zhou, L. Shang, S. Jin, S. Cao, D. Che, F. Liu, Y. Yu // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – № 1. – P. 16053.
208. Patel S. IL-10 production in non-small cell lung carcinoma patients is regulated by ERK, P38 and COX-2 [Text] / S. Patel, S. Vetale, P. Teli, R. Mistry, S. Chiplunkar // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2012. – Vol. 16. – № 3. – P. 531-544.
209. Pistoia V. Production of cytokines by human B cells in health and disease [Text] / V. Pistoia // *Immunology Today*. – 1997. – Vol. 18. – № 7. – P. 343-350.
210. Pitt J.M. Targeting the tumor microenvironment: removing obstruction to anticancer immune responses and immunotherapy [Text] / J.M. Pitt, A. Marabelle, A. Eggermont, J.-C. Soria, G. Kroemer, L. Zitvogel // *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. – 2016. – Vol. 27. – № 8. – P. 1482-1492.
211. Poole S. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10 [Text] / S. Poole, F.Q. Cunha, S. Selkirk, B.B. Lorenzetti, S.H. Ferreira // *British Journal of Pharmacology*. – 1995. – Vol. 115. – № 4. – P. 684-688.

212. Prokopchuk O. Interleukin-4 enhances proliferation of human pancreatic cancer cells: evidence for autocrine and paracrine actions [Text] / O. Prokopchuk, Y. Liu, D. Henne-Bruns, M. Kornmann // *British Journal of Cancer*. – 2005. – Vol. 92. – № 5. – P. 921-928.
213. Pyeon D. Prostaglandin E(2) increases bovine leukemia virus tax and pol mRNA levels via cyclooxygenase 2: regulation by interleukin-2, interleukin-10, and bovine leukemia virus [Text] / D. Pyeon, F.J. Diaz, G.A. Splitter // *Journal of Virology*. – 2000. – Vol. 74. – № 12. – P. 5740-5745.
214. Qian B. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis [Text] / B. Qian, J.W. Pollard // *Cell*. – 2010. – Vol. 141. – № 1. – P. 39-51.
215. Quail D.F. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis [Text] / D.F. Quail, J.A. Joyce // *Nature Medicine*. – 2013. – Vol. 19. – № 11. – P. 1423-1437.
216. Ranasinghe C. IL-4 and IL-13 receptors: roles in immunity and powerful vaccine adjuvants [Text] / C. Ranasinghe, S. Trivedi, D.K. Wijesundara, R.J. Jackson // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. – 2014. – Vol. 25. – № 4. – P. 437-442.
217. Reiersølmoen A.C. Identification of fused pyrimidines as interleukin 17 secretion inhibitors [Text] / A.C. Reiersølmoen, J. Han, E. Sundby, B.H. Hoff // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2018. – Vol. 155. – P. 562-578.
218. Richards D.M. Monocytes and macrophages in cancer: development and functions [Text] / D.M. Richards, J. Hettinger, M. Feuerer // *Cancer Microenvironment: Official Journal of the International Cancer Microenvironment Society*. – 2013. – Vol. 6. – № 2. – P. 179-191.
219. Rico M.J. Modulation of IL-10/IL-10R expression by mafosfamide, a derivative of 4-hydroxycyclophosphamide, in a rat B-cell lymphoma [Text] / M.J. Rico, P. Matar, O.G. Scharovsky // *Biocell*. – 2012. – Vol. 36. – № 2. – P. 91-95.
220. Romagnani S. Biology of human TH1 and TH2 cells [Text] / S. Romagnani // *Journal of Clinical Immunology*. – 1995. – Vol. 15. – № 3. – P. 121-129.
221. Sachs B. Akute Überempfindlichkeitsreaktionen auf monoklonale Antikörper zur zielgerichteten Therapie [Text] / B. Sachs, H.F.Merk. // *Hautarzt*. – 2018. – Vol. 69. – P. 268–277.
222. Sakai Y. Conjugated linoleic acid reduced metastasized LL2 tumors in mouse peritoneum [Text] / Y. Sakai, T. Sasahira, H. Ohmori, K. Yoshida, H. Kuniyasu // *Virchows Archiv*. – 2006. – Vol. 449. – № 3. – P. 341-347.
223. Santoni M. Emerging role of tumor-associated macrophages as therapeutic targets in patients with metastatic renal cell carcinoma [Text] / M. Santoni, F. Massari, C. Amantini, M. Nabissi,

- F. Maines, L. Burattini, R. Berardi, G. Santoni, R. Montironi, G. Tortora, S. Cascinu // *Cancer immunology, immunotherapy*. – 2013. – Vol. 62. – № 12. – P. 1757-1768.
224. Schreiber R.D. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion [Text] / R.D. Schreiber, L.J. Old, M.J. Smyth // *Science*. – 2011. – Vol. 331. – № 6024. – P. 1565-1570.
225. Sharon E. Immune checkpoint inhibitors in clinical trials [Text] / E. Sharon, H. Streicher, P. Goncalves, H.X. Chen // *Chinese Journal of Cancer*. – 2014. – Vol. 33. – № 9. – P. 434-444.
226. Shiao S.L. Immune microenvironments in solid tumors: new targets for therapy [Text] / S.L. Shiao, A.P. Ganesan, H.S. Rugo, L.M. Coussens // *Genes & Development*. – 2011. – Vol. 25. – № 24. – P. 2559-2572.
227. Shimoda K. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene [Text] / K. Shimoda, J. van Deursen, M.Y. Sangster, S.R. Sarawar, R.T. Carson, R.A. Tripp, C. Chu, F.W. Quelle, T. Nosaka, D.A. Vignali, P.C. Doherty, G. Grosveld, W.E. Paul, J.N. Ihle // *Nature*. – 1996. – Vol. 380. – № 6575. – P. 630-633.
228. Shinriki S. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody suppresses tumor angiogenesis and in vivo growth of human oral squamous cell carcinoma [Text] / S. Shinriki, H. Jono, K. Ota, M. Ueda, M. Kudo, T. Ota, Y. Oike, M. Endo, M. Ibusuki, A. Hiraki, H. Nakayama, Y. Yoshitake, M. Shinohara, Y. Ando // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2009. – Vol. 15. – № 17. – P. 5426-5434.
229. Shirota H. IL4 from T Follicular Helper Cells Downregulates Antitumor Immunity [Text] / H. Shirota, D.M. Klinman, S.-E. Ito, H. Ito, M. Kubo, C. Ishioka // *Cancer Immunology Research*. – 2017. – Vol. 5. – № 1. – P. 61-71.
230. Shurin M.R. Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy [Text] / M.R. Shurin, L. Lu, P. Kalinski, A.M. Stewart-Akers, M.T. Lotze // *Springer Seminars in Immunopathology*. – 1999. – Vol. 21. – № 3. – P. 339-359.
231. Sica A. Macrophage polarization in tumour progression [Text] / A. Sica, P. Larghi, A. Mancino, L. Rubino, C. Porta, M.G. Totaro, M. Rimoldi, S.K. Biswas, P. Allavena, A. Mantovani // *Seminars in Cancer Biology*. – 2008. – Vol. 18. – № 5. – P. 349-355.
232. Silvestre J.S. Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb [Text] / J.S. Silvestre, Z. Mallat, M. Duriez, R. Tamarat, M.F. Bureau, D. Scherman, N. Duverger, D. Branellec, A. Tedgui, B.I. Levy // *Circulation Research*. – 2000. – Vol. 87. – № 6. – P. 448-452.
233. Slevin M. Activation of MAP kinase (ERK-1/ERK-2), tyrosine kinase and VEGF in the human brain following acute ischaemic stroke [Text] / M. Slevin, J. Krupinski, A. Slowik, F. Rubio, A. Szczudlik, J. Gaffney // *Neuroreport*. – 2000. – Vol. 11. – № 12. – P. 2759-2764.

234. Sun Z. Serum IL-10 from systemic lupus erythematosus patients suppresses the differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells [Text] / Z. Sun, R. Zhang, H. Wang, P. Jiang, J. Zhang, M. Zhang, L. Gu, X. Yang, M. Zhang, X. Ji // *Journal of Biomedical Research*. – 2012. – Vol. 26. – № 6. – P. 456-466.
235. Sung W.-W. IL-10 promotes tumor aggressiveness via upregulation of CIP2A transcription in lung adenocarcinoma [Text] / W.-W. Sung, Y.-C. Wang, P.-L. Lin, Y.-W. Cheng, C.-Y. Chen, T.-C. Wu, H. Lee // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2013. – Vol. 19. – № 15. – P. 4092-4103.
236. Sutherland K.D. Cell of origin of lung cancer / K.D. Sutherland, A. Berns // *Molecular Oncology*. – 2010. – Vol. 4. – № 5. – P. 397-403.
237. Takahashi H. Interleukin-17 enhances bFGF-, HGF- and VEGF-induced growth of vascular endothelial cells [Text] / H. Takahashi, M. Numasaki, M.T. Lotze, H. Sasaki // *Immunology Letters*. – 2005. – Vol. 98. – № 2. – P. 189-193.
238. Takeda K. Essential role of Stat6 in IL-4 signaling [Text] / K. Takeda, T. Tanaka, W. Shi, M. Matsumoto, M. Minami, S. Kashiwamura, K. Nakanishi, N. Yoshida, T. Kishimoto, S. Akira // *Nature*. – 1996. – Vol. 380. – № 6575. – P. 627-630.
239. Tanaka T. A new era for the treatment of inflammatory autoimmune diseases by interleukin-6 blockade strategy [Text] / T. Tanaka, M. Narazaki, A. Ogata, T. Kishimoto // *Seminars in Immunology*. – 2014. – Vol. 26. – № 1. – P. 88-96.
240. Tang J. Roles of interleukin-10 differentiated dendritic cell of allergic asthma patients in T-lymphocyte proliferation in vitro [Text] / J. Tang, S. Guan, Z. Wang // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. – 2012. – Vol. 92. – № 40. – P. 2851-2854.
241. Tang X. Anti-tumour strategies aiming to target tumor-associated macrophages [Text] / X. Tang, C. Mo, Y. Wang, D. Wei, H. Xiao // *Immunology*. – 2013. – Vol. 138. – № 2. – P. 93-104.
242. Taniguchi K. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer [Text] / K. Taniguchi, M. Karin // *Seminars in Immunology*. – 2014. – Vol. 26. – № 1. – P. 54-74.
243. Tirado-Rodriguez B. TGF- β : an important mediator of allergic disease and a molecule with dual activity in cancer development [Text] / Tirado-Rodriguez B., Enrique Ortega, Patricia Segura-Medina, Sara Huerta-Yepez // *Journal of Immunology Research*. - 2014. -Vol.2014 - P.1-15
244. Todaro M. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4 [Text] / M. Todaro, M.P. Alea, A.B. Di Stefano, P. Cammareri, L. Vermeulen, F.

- Iovino, C. Tripodo, A. Russo, G. Gulotta, J.P. Medema, G. Stassi // *Cell Stem Cell*. – 2007. – Vol. 1. – № 4. – P. 389-402.
245. Trompezinski S. IL-10 is unable to downregulate VEGF expression in human activated keratinocytes [Text] / S. Trompezinski, A. Denis, D. Schmitt, J. Viac // *Archives of Dermatological Research*. – 2002. – Vol. 294. – № 8. – P. 377-379.
246. Ueda O. Novel genetically humanized mouse model established to evaluate efficacy of therapeutic agents to human interleukin 6 receptor [Text] / Ueda O., Tateishi H., Higuchi Y. // *Sci. Rep.* - 2013. - №3. -P. 1196.
247. Upshaw J.N. Fluoropyrimidine cardiotoxicity: time for a contemporaneous appraisal [Text] / J.N. Upshaw, A. O'Neill, J.R. Carver, E.P. Dimond, C.S. Denlinger, S.M. Kircher, L.I. Wagner, B. Ky, J.M. Brell // *Clinical colorectal cancer*. – 2019. – Vol. 18. – Fluoropyrimidine cardiotoxicity. – № 1. – P. 44-51.
248. Vahl J.M. Interleukin-10-regulated tumour tolerance in non-small cell lung cancer [Text] / J.M. Vahl, J. Friedrich, S. Mittler, S. Trump, L. Heim, K. Kachler, L. Balabko, N. Fuhrich, C.-I. Geppert, D.I. Trufa, N. Sopel, R. Rieker, H. Sirbu, S. Finotto // *British Journal of Cancer*. – 2017. – Vol. 117. – № 11. – P. 1644-1655.
249. Venmar K.T. IL-4 receptor ILR4 α regulates metastatic colonization by mammary tumors through multiple signaling pathways [Text] / K.T. Venmar, K.J. Carter, D.G. Hwang, E.A. Dozier, B. Fingleton // *Cancer research*. – 2014. – Vol. 74. – № 16. – P. 4329-4340.
250. Vitkause A. Circulating inflammatory markers in cervical cancer patients and healthy controls [Text] / A. Vitkause, D. Urboniene, J. Celiesinte, K. Jariene, E. Skrodeniene // *Journal of Immunotoxicology*. - 2020. - Vol.17. - № 1. - P.105-109.
251. Wakita D. Tumor-infiltrating IL-17-producing gamma-delta T cells support the progression of tumor by promoting angiogenesis [Text] / D. Wakita, K. Sumida, Y. Iwakura, H. Nishikawa, T. Ohkuri, K. Chamoto, H. Kitamura, T. Nishimura // *European Journal of Immunology*. – 2010. – Vol. 40. – № 7. – P. 1927-1937.
252. Wang H.-W. Alternative activation of tumor-associated macrophages by IL-4: priming for protumoral functions [Text] / H.-W. Wang, J.A. Joyce // *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*. – 2010. – Vol. 9. – № 24. – P. 4824-4835.
253. Wang R. Increased IL-10 mRNA expression in tumor-associated macrophage correlated with late stage of lung cancer [Text] / R. Wang, M. Lu, J. Zhang, S. Chen, X. Luo, Y. Qin, H. Chen // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*. – 2011. – Vol. 30. – № 1. – P. 62.

254. Wang, L. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway [Text] / Wang L., Yi T., Kortylewski M., Pardoll D.M., Zeng D., Yu H. // *J. Exp. Med.* - 2009. - № 206 (7). - P.1457–1464.
255. Wang, M. IL-17A/IL-17RA interaction promoted metastasis of osteosarcoma cells [Text] / Wang M., Wang L., Ren T., Xu L., Wen Z.// *Cancer Biol. Ther.*// -2013. - № 14 (2). -P. 155–163
256. Weaver C.T. IL-17 Family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages [Text] / C.T. Weaver, R.D. Hatton, P.R. Mangan, L.E. Harrington // *Annual Review of Immunology.* – 2007. – Vol. 25. – № 1. – P. 821-852.
257. Wei H. Functional expression and characterization of grass carp IL-10: an essential mediator of TGF- β 1 immune regulation in peripheral blood lymphocytes [Text] / Wei H., Yang M., Zhao T., Wang X., Zhou H. // *Mol. Immunol.* - 2013. - № 53 (4). - P.313–320.
258. Welsh T.J. Macrophage and mast-cell invasion of tumor cell islets confers a marked survival advantage in non-small-cell lung cancer [Text] / T.J. Welsh, R.H. Green, D. Richardson, D.A. Waller, K.J. O’Byrne, P. Bradding // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology.* – 2005. – Vol. 23. – № 35. – P. 8959-8967.
259. Wu Z. Capecitabine versus continuous infusion fluorouracil for the treatment of advanced or metastatic colorectal cancer: a meta-analysis [Text] / Z. Wu, Y. Deng // *Current Treatment Options in Oncology.* – 2018. – Vol. 19. –№ 12. – P. 77.
260. Yalcin A.D. IL-8, IL-10, TGF- β , and GCSF levels were increased in severe persistent allergic asthma patients with the anti-IgE treatment [Text] / A.D. Yalcin, A. Bisgin, R.M. Gorczynski // *Mediators of Inflammation.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 720976.
261. Yamagiwa Y. Interleukin-6 decreases senescence and increases telomerase activity in malignant human cholangiocytes [Text] / Y. Yamagiwa, F. Meng, T. Patel // *Life sciences.* – 2006. – Vol. 78. – № 21. – P. 2494-2502.
262. Yuzhalin A.E. Interleukins in Cancer Biology: Their Heterogeneous Role [Text] / A. E. Yuzhalin, A. G. Kutikhin / *TNQ Books and Journals.* - 2014. - 349 p.
263. Zdanov A. Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon-gamma [Text] / A. Zdanov, C. Schalk-Hihi, A. Gustchina, M. Tsang, J. Weatherbee, A. Wlodawer // *Structure.* – 1995. – Vol. 3. – № 6. – P. 591-601.
264. Zeng L. IL-10 promotes resistance to apoptosis and metastatic potential in lung tumor cell lines [Text] / L. Zeng, C. O’Connor, J. Zhang, A.M. Kaplan, D.A. Cohen // *Cytokine.* – 2010. – Vol. 49. – № 3. – P. 294-302.
265. Zhang B. M2-Polarized tumor-associated macrophages are associated with poor prognoses resulting from accelerated lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma [Text] / B. Zhang, G. Yao,

- Y. Zhang, J. Gao, B. Yang, Z. Rao, J. Gao // *Clinics*. – 2011. – Vol. 66. – № 11. – P. 1879-1886.
266. Zhang K.-D. Apoptosis of Lewis lung carcinoma cells induced by microwave via p53 and proapoptotic proteins in vivo [Text] / K.-D. Zhang, L.-R. Tong, S.-M. Wang, R.-Y. Peng, H.-D. Huang, Y.-C. Dong, X.-X. Zhang, Q. Li, C. Bai // *Chinese Medical Journal*. – 2017. – Vol. 130. – № 1. – P. 15-22.
267. Zhang Q. Interleukin-17 promotes prostate cancer via MMP7-induced epithelial-to-mesenchymal transition [Text] / Q. Zhang, S. Liu, K.R. Parajuli, W. Zhang, K. Zhang, Z. Mo, J. Liu, Z. Chen, S. Yang, A.R. Wang, L. Myers, Z. You // *Oncogene*. – 2017. – Vol. 36. – № 5. – P. 687-699.
268. Zhang W.J. IL-4-induced Stat6 activities affect apoptosis and gene expression in breast cancer cells [Text] / W.J. Zhang, B.H. Li, X.Z. Yang, P.D. Li, Q. Yuan, X.H. Liu, S.B. Xu, Y. Zhang, J. Yuan, G.S. Gerhard, K.K. Masker, C. Dong, W.A. Koltun, M.J. Chorney // *Cytokine*. – 2008. – Vol. 42. – № 1. – P. 39-47.
269. Zitvogel L. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion [Text] / L. Zitvogel, A. Tesniere, G. Kroemer // *Nature Reviews. Immunology*. – 2006. – Vol. 6. – № 10. – P. 715-727.
270. Ziegler Ed. J.L. Experimental Evaluation of Antitumor Drugs in the USA and USSR and Clinical Correlations [Text] / Ziegler Ed. J.L. // *Monograph National Cancer Institute*. - 1972. - P.67
271. Zola P. Treatment of early cervical cancer: survival, complications and economical aspects [Text] / P. Zola, E. Tripodi, V. Zanfagnin, C. Baima Poma, S. Perotto, P. Modaffari, F. Martra, L. Fuso // *Сибирский онкологический журнал*. – 2012. – № 3. - С.5-13
272. Zyuzkov G.N. Antitumor effects of JAK3 inhibitor on the model of transplantable Lewis lung carcinoma and mechanisms of their development [Text] / G.N. Zyuz'kov, E.N. Amosova, A.V. Chaikovskii, L.A. Miroshnichenko, E.V. Udut, O.Y. Rybalkina, V.V. Zhdanov, V.V. Udut, A.M. Dygai, E.P. Zueva // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2016. – Vol. 161. – № 3. – P. 367-370.