

ЛОГИКО-ИНФОРМАЦИОННАЯ МОДЕЛЬ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТОВ
ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ
РАКОВЫХ КЛЕТОК

**В.В. Бурляев¹, А.А. Давыденко^{1,@}, В.Ф. Корнюшко¹, Л.И. Руссу²,
М.В. Мезенцева²**

¹Московский технологический университет (Институт тонких химических технологий),
Москва 119571, Россия

²Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи Минздрава России, Москва 123098, Россия

@ Автор для переписки, e-mail: andrey@darmena.ru

В работе рассматриваются лабораторные доклинические исследования воздействия таргетных противоопухолевых препаратов на жизнедеятельность культур клеток ракового происхождения А-549 (карцинома легкого). Доклинические исследования дают возможность оценить эффективность применения таргетных препаратов, возможные противопоказания и побочные эффекты, чтобы в дальнейшем определиться с объемом клинических испытаний и самой возможностью их проведения. Предлагается разработка информационной поддержки доклинических научных исследований. Рассмотрено применение технологии функционального моделирования для построения логико-информационных моделей в номинации IDEF0. Детализация модели состоит в поэтапном рассмотрении всего процесса исследования. Необходимость информационной поддержки исследований связана с задачами структуризации, хранения и обработки больших объемов экспериментальных данных.

Ключевые слова: информационная поддержка, IDEF0, доклинические исследования, таргетные препараты, раковая клетка, GLP, логико-информационная модель.

LOGICAL-INFORMATION MODEL OF EVALUATION THE IMPACT
OF TARGETED THERAPY DRUGS ON THE BIOLOGICAL ACTIVITY
OF CANCER CELLS

**V.V. Burlyaev¹, A.A. Davydenko^{1,@}, V.F. Korniyushko¹, L.I. Russu²,
M.V. Mezentseva²**

¹Moscow Technological University (Institute of Fine Chemical Technologies),
Moscow 119571, Russia

²N.F. Gamaleya Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology of the Ministry
of Health of the Russian Federation, Moscow 123098, Russia

@ Corresponding author e-mail: andrey@darmena.ru

The paper deals with laboratory preclinical studies of the impact of targeted anticancer drugs on the life of A-549 cell cultures of the cancer origin (lung carcinoma). Preclinical studies enable evaluating the effectiveness of targeted therapy drugs, possible contraindications and side effects in order to determine in future the scope of clinical trials and the possibility of performing them. It is proposed to develop information support of preclinical research. In this work the use of functional modeling technology for building a logic-information model in the category of IDEF0 is

considered. For detailed elaboration of the model it is necessary to review step-by-step the whole research process. The necessity of creating the information support is connected to the tasks of structuring, storage and processing large amounts of experimental data.

Keywords: *information support, IDEF0, preclinical studies, targeted therapy drugs, cancer cell, GLP, logical-information model.*

Распоряжением Правительства РФ № 2511-р от 24 декабря 2012 года утверждена «Государственная программа развития здравоохранения Российской Федерации».

Одним из важных направлений Программы является проблема информатизации здравоохранения. Для ее реализации была разработана «Концепция информатизации здравоохранения», в основе которой – создание отраслевой информационной системы¹. При этом предполагается формирование единых справочных информационных баз данных и блока персонифицированного учета потребителей медицинской помощи для планирования объемов помощи, сбора более качественной статистики и отчетности.

Следует заметить, что, несмотря на определенные экономические трудности, переживаемые страной в последнее время, отдельные элементы проекта информатизации здравоохранения страны успешно реализуются. Так, с 2011 года российское здравоохранение довольно успешно переходит на электронные медицинские карты и удаленную запись к врачам через Internet. Успешно внедряются типовые системы управления персоналом, управления заказами и материально-техническим снабжением медицинскими материалами и оборудованием, управления запасами лекарственных средств и медицинского оборудования на типовых системах ИС. Разработаны специально для медицинских учреждений и успешно внедряются типовые подсистемы «ИС:Медицина. Поликлиника», «ИС:Медицина. Стационар», «ИС:Медицина. Больничная аптека», «ИС:Медицина. Клиническая лаборатория» и другие².

Однако есть область разработки и применения информационных технологий, где, по-видимому, еще долго не удастся предложить типовых решений. Это проблема разработки:

- автоматизированных рабочих мест (АРМ) врачей-специалистов;
- организация информационного взаимодействия внутри учреждения среднего медицинского персонала, научных сотрудников, сотрудников приемного отделения, лаборатории, диагностических кабинетов, аптеки.

¹Приказ Минздравсоцразвития России от 28 апреля 2011 г. № 364 «Об утверждении Концепции создания единой государственной информационной системы в сфере здравоохранения».

²Интернет-источник <http://solutions.1c.ru/catalog>.

Для разработки этих элементов информатизации практически нет типовых решений, что связано с большим разнообразием задач, и в каждом отдельном случае необходима разработка эксклюзивной информационной системы. Для этого используются методы системного анализа, в том числе методологии системного моделирования SADT, моделирования потоков данных DFD, проектирования баз данных IDEF1X, методологии семейства ICAM (IDEF0, IDEF1X) [1].

В работе рассмотрено применение технологии функционального моделирования для построения логико-информационных моделей в номинации IDEF0 для разработки информационной поддержки исследования инновационных лекарственных препаратов таргетной онкотерапии.

Одной из актуальных проблем современной медицины является дальнейшее совершенствование существующих и разработка новых методов диагностики и лечения злокачественных новообразований. Одним из современных методов лечения является таргетная терапия – лечение опухолей с помощью препаратов, действующих непосредственно на клетку-мишень и минимально воздействующих на здоровые клетки. Таргетная терапия основана на изучении и понимании молекулярных механизмов развития той или иной опухоли и разработке препаратов, непосредственно влияющих на специфическую молекулу, которая связана с ростом опухолевых клеток [2, 3]. Препараты таргетной терапии гораздо менее токсичны, чем химиопрепараты, поэтому могут быть применены в тех случаях, когда химиотерапия противопоказана, например, в отношении пожилых или находящихся в тяжелом состоянии пациентов. Кроме того, эти препараты могут быть использованы, когда пациент страдает онкологическим заболеванием, не чувствительным к традиционной химиотерапии.

Процесс создания таргетного лекарства очень долгий и трудоемкий. Он включает в себя множество испытаний в центре доклинических исследований, без которых невозможно появление препарата на рынке. Именно доклинические исследования таких препаратов являются основой для проведения в дальнейшем дорогостоящих клинических испытаний.

Эти исследования дают возможность оценить эффективность применения таргетных препаратов, противопоказания и побочные эффекты, чтобы в дальнейшем определиться с объемом клинических испытаний и самой возможностью их проведения.

Кроме того, с помощью этих исследований определяют дозозависимость эффектов лекарства. Именно доклинические исследования дают возможность узнать максимально возможную безопасную дозу, а также целесообразность ее повышения.

Проведение доклинических исследований обязательно сопровождается подробным отчетом обо всех важных аспектах проведенной работы, в том числе о способах введения препарата, применяемых концентрациях, он также содержит обработанные данные полученных результатов. Кроме того обосновываются предполагаемые дозы препарата для будущих клинических испытаний.

Одной из особенностей таких доклинических испытаний является то, что они проводятся с использованием международной системы качества и безопасности испытаний лекарственных средств GLP (надлежащая лабораторная практика), в частности, по национальному стандарту РФ «Принципы надлежащей лабораторной практики»³. Кроме того, они проводятся в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств»⁴.

Доклинические исследования проводятся по утвержденному разработчиком лекарственного средства плану с ведением протокола и составлением отчета о результатах доклинического исследования [4].

В нашей работе рассматриваются лабораторные доклинические исследования воздействия таргетных противоопухолевых препаратов на жизнедеятельность культур клеток ракового происхождения А-549 (карцинома легкого), в рамках которых изучаются факторы, оказывающие наибольшее цитологическое воздействие на клетки в исследуемых культурах. Характерной особенностью данных исследований является выбор эта-

лонных раковых клеток из коллекции культур тканей, хранящейся в Федеральном научно-исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи.

Предполагается разработка информационной поддержки доклинических научных исследований, обеспечивающей прогнозирование противоопухолевого эффекта таргетных препаратов. Необходимость создания информационной поддержки исследований связана с задачами структуризации, хранения и обработки больших объемов экспериментальных данных.

Первым этапом построения поддержки доклинических научных исследований является построение вербальной (семантической) модели, представленной в таблице.

В основе проектирования информационной поддержки лежит логико-информационная модель, описывающая методику проведения доклинических испытаний. Для построения такой модели была использована методология IDEF0⁵. Методология IDEF0 и ранее использовалась в научных исследованиях, связанных с созданием новых лекарственных препаратов [5].

Модель, построенная в рамках методологии IDEF0, представляет собой совокупность графических диаграмм, иерархически упорядоченных от обобщенного описания к частному. Графическая диаграмма – главный компонент модели. Каждая графическая диаграмма состоит из функциональных блоков и соединяющих их стрелок. На наиболее общем уровне модель состоит из одного функционального блока, на вход которого поступают исходные таргетные препараты и данные из коллекции культур тканей Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи. На выходе должна быть сфор-

Семантическая модель процесса исследования инновационных лекарственных препаратов таргетной онкотерапии в табличной форме

Функции	Документы (методики и стандарты)	Выполняемые операции
Изготовление среды культивирования раковых клеток и подготовка к исследованиям	Методика проведения испытаний, стандарты GLP	Рассеивание подготовленных раковых клеток в луночную панель и инкубация в термостате
Изучение пролиферативной клеточной активности при воздействии препарата	Методика проведения испытаний, стандарты GLP	Инкубация клеток с препаратом, проведение МТТ-теста, оценивание жизнеспособности раковых клеток по интенсивности окраски раствора по оптической плотности
Изучение изменения функциональной активности раковых клеток	Методика проведения испытаний, стандарты GLP	Определение активности мРНК цитокинов методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР), регистрация результатов ОТ-ПЦР электрофоретически, идентификация нуклеотидных последовательностей
Математическая обработка результатов исследований	Методика проведения испытаний, стандарты GLP	Статистический анализ

³ГОСТ 33647-2015 Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). М.: Стандартинформ, 2016.

⁴Интернет-источник <http://www.eurasiancommission.org/ru/act/txnnreg/deptexreg/konsultComitet/Documents/GLP версия 3.pdf>

⁵Рекомендации по стандартизации. Информационные технологии поддержки жизненного цикла продукции. Методология функционального моделирования. М.: Госстандарт России, 2001. 19 с.

мирована математическая прогностическая модель воздействия препарата на раковые клетки (рис. 1).

Дальнейшая детализация модели состоит в поэтапном рассмотрении всего процесса исследования. Результаты информационного моделирования представлены на рис. 2. Из рисунка видно, что каждый этап описан в виде функционального блока. В процессе детализации выявлены информационные взаимосвязи между этапами.

Рассмотрим дальнейшую детализацию каждого из этапов.

Модель этапа подготовки материалов представлена на рис. 3. На входе соответствующего функционального блока – препарат и эталонные раковые клетки, на

выходе – подготовленные материалы для исследования.

На этапе подготовки материалов выполняются следующие операции

- подготовка препарата в заданных разведениях;
- подготовка раковых клеток в заданной концентрации и заданного объема;
- рассеивание подготовленных раковых клеток в специальную луночную панель;
- инкубация в термостате с CO₂ при 37 °С;
- внесение препарата в заданных концентрациях в лунки через 24 ч.

Подготовленные материалы являются исходными для 2-го и 3-го этапов.



Рис. 1. Обобщенная модель проведения доклинических испытаний таргетного препарата.

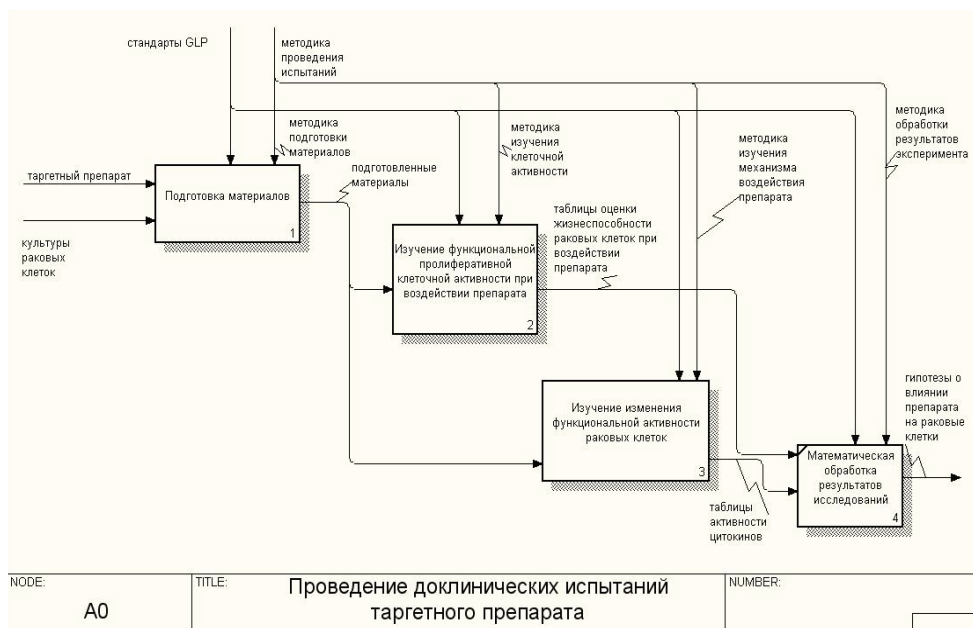


Рис. 2. Детализированная модель проведения доклинических испытаний таргетного препарата.

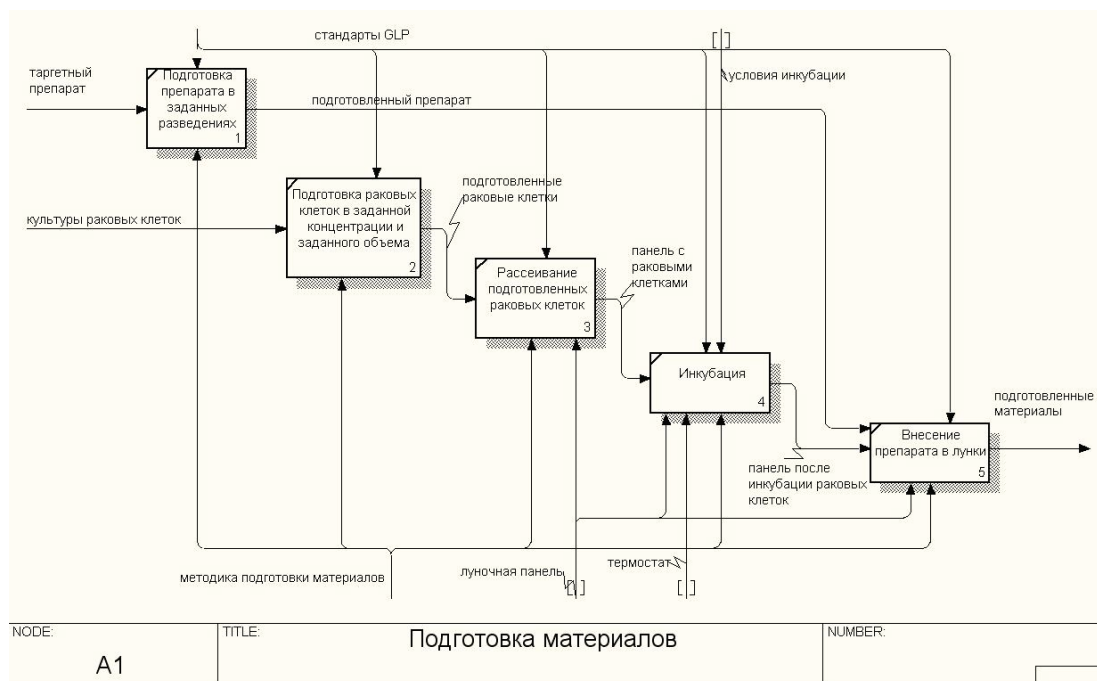


Рис. 3. Модель этапа «Подготовка материалов».

Для измерения выживаемости клеток используется метод МТТ [6, 7], который включен в большинство протоколов методов молекулярной биологии и медицины. В его основе лежит реакция восстановления желтой соли тетразолия (МТТ) митохондриальными дегидрогеназами живых клеток до пурпурных кристаллов формазана, которые нерастворимы в водной среде обитания клеток. Кристаллы формазана (МТТ-ф) растворяют в ДМСО или в смеси HCl–изопропанол и определяют колориметрически. Эта процедура убивает живые клетки. Преимуществами данного метода является экономичность и отличная воспроизводимость результатов.

На 2-м этапе выполняются следующие операции:

- инкубация клеток с препаратом в течение 2, 24 и 48 ч в термостате CO₂ при 37 °С;
- проведение МТТ-теста;
- оценивание жизнеспособности раковых клеток по интенсивности окраски раствора (по оптической плотности).

Результаты выполнения этого этапа документируются в виде таблиц, фиксирующих оценку жизнеспособности раковых клеток при воздействии препарата заданной концентрации и в заданном разведении. Модель этапа показана на рис. 4.

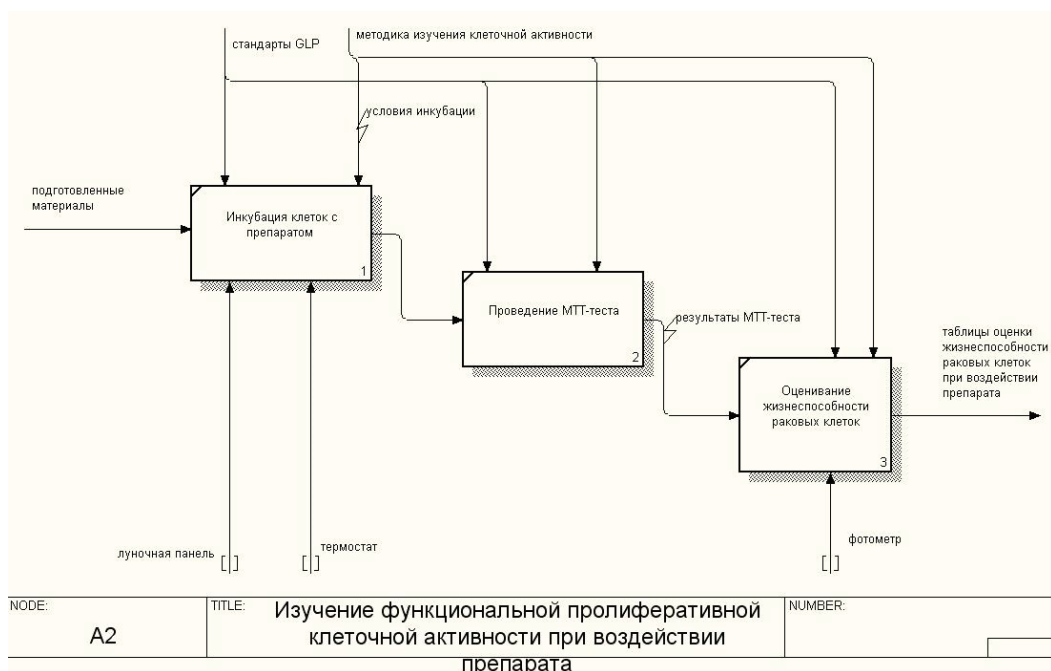


Рис. 4. Модель изучения пролиферативной клеточной активности при воздействии препарата.

На следующем этапе происходит поиск молекулярных факторов или иммунологических параметров, предсказывающих чувствительность к иммунотерапии. Полученные за последние несколько лет данные о состоянии иммунной системы у онкологических больных свидетельствуют, что рост большинства злокачественных новообразований сопровождается определенными нарушениями иммунного ответа. Эти данные послужили основанием для использования методов цитокинотерапии как самостоятельного метода, так и в составе комплексного лечения злокачественных новообразований.

Современная диагностика цитокинов требует наличия точных и чувствительных методов их измерения. Несмотря на большое число методик, разработанных для определения уровня цитокинов в клетках, тканях и биологических жидкостях, не все они удовлетворяют требованиям точности, чувствительности, воспроизводимости, доступности, простоты исполнения и низкой стоимости проведения анализа. Кроме того, для характеристики цитокинового статуса наиболее целесообразным является одновременное измерение нескольких цитокинов в одном эксперименте.

Определение уровня продукции мРНК цитокинов производится методом полимеразной цепной

реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [8]. Это самый чувствительный метод для обнаружения мРНК в настоящее время.

Перед ПЦР проводят на матрице мРНК синтез одноцепочечной ДНК с помощью обратной транскриптазы и получают одноцепочечную комплементарную ДНК (кДНК), которая используется в качестве матрицы для ПЦР. Суть метода ПЦР состоит в том, что определенные участки ДНК в процессе повторяющихся температурных циклов многократно копируются (амплификация). При каждом цикле амплификации синтезированные ранее фрагменты снова копируются ДНК-полимеразой. Поэтому происходит увеличение количества специфических фрагментов ДНК в миллиарды раз.

На 3-м этапе выполняются следующие операции:

- определение уровня продукции мРНК цитокинов методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции;
- регистрация результатов ОТ-ПЦР электрофоретически;
- идентификация нуклеотидных последовательностей маркером для электрофореза «PROMTGA».

Модель этапа представлена на рис. 5.

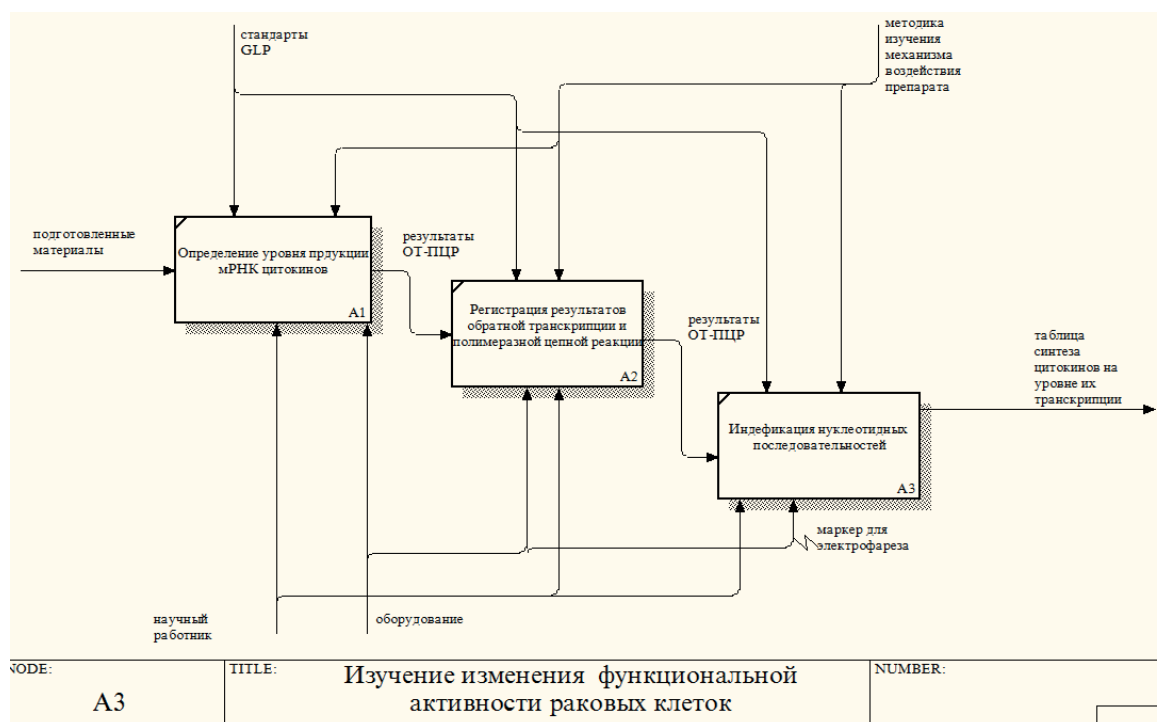


Рис. 5. Модель изучения изменения функциональной активности раковых клеток.

Финальным этапом является математический анализ полученных результатов. Для проверки и количественного анализа взаимосвязей между груп-

пами цитокинов и пролиферативной активностью раковых клеток использован статистический анализ. При выборе методов статистического анализа

были учтены характерные особенности исследуемой задачи. Отметим, что многочисленными исследованиями доказан синергизм действия цитокинов на клетки. Многие иммунные реакции обусловлены согласованным действием нескольких цитокинов. При этом одни цитокины способны усиливать или ослаблять продукцию других цитокинов. Поэтому при анализе влияния уровней транскрипции цитокинов на пролиферативную активность раковых клеток необходимо учитывать синергическое взаимодействие цитокинов. Таким образом, важным этапом исследований является отбор групп цитокинов, влияние которых должно анализироваться совместно. Ряд таких комбинаций выявлен и изучен при исследовании механизмов взаимодействия ци-

токинов с клетками, другие могут быть сформированы в качестве гипотез в процессе анализа экспериментальных данных. В качестве базового объекта статистического анализа использованы таблицы сопряженности. Детализация этого этапа подробно описана в [9, 10].

В результате проведенных исследований показано, что предложенные логико-информационные модели доклинических исследований являются достаточно эффективными и могут быть использованы при оценке влияния противоопухолевых таргетных препаратов на пролиферативную активность раковых клеток. Необходимо отметить, что слабым звеном в информатизации технологии доклинических исследований является отсутствие баз экспериментальных данных.

Список литературы:

1. Бурляева Е.В., Колыбанов К.Ю., Панова С.А. Информационная поддержка систем принятия решений на производственных предприятиях химического профиля. М.: Изд-во МИТХТ, 2013. 196 с.
2. Laroix M. Targeted Therapies in Cancer. NY: Nova Science Publishers, 2014.
3. Брюзгин В.В., Платинский Л.В. Роль цитокинов в химиотерапии злокачественных опухолей: практика применения цитокиновых препаратов Рефнот и Ингарон при распространенных опухолевых процессах с множественными метастазами // Современная онкология. 2014. Т. 16. № 11. С. 2–7.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
5. Бурляева Е.В., Миронова Н.А. Функциональное моделирование производства нового фотосенсибилизатора третьего поколения для фотодинамической терапии рака // Вестник МИТХТ. 2013. Т. 8. № 2. С. 95–100.
6. Харбиев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005. 832 с.
7. Chomezynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Analyt. Biochem.* 1987. V. 162. P. 156–159.
8. Gelder C.M., Thomas P.S., Yates D.H., Adcock I.M., Morrison J.F.J., Barnes P. Cytokine expression in normal, atopic and asthmatic subject using the combination of sputum induction and the polymerase chain reaction // *Thorax.* 1995. V. 50. P. 1033–1037.
9. Бурляев В.В., Давыденко А.А. Индуктивный вывод в информационной системе прогнозирования противоопухолевого эффекта таргетных препаратов иммунотерапии // Информационные и телекоммуникационные технологии. 2016. № 29. С. 3–8.

References:

1. Burlyayeva E.V., Kolybanov K.Yu., Panova S.A. Informational support of decision-making systems at industrial enterprises of the chemical profile. M.: MITHT Publ., 2013. 196 p. (in Russ.).
2. Laroix M. Targeted Therapies in Cancer. NY: Nova Science Publishers, 2014.
3. Bryuzgin V.V., Platinskiy L.V. The role of cytokines in the chemotherapy of malignant tumors: the practice of the use of cytokine drugs Refnot and Inharon in widespread tumor processes with multiple metastases // *Sovremennaya onkologiya (Modern Oncology)*. 2014. V. 16. № 11. P. 2–7. (in Russ.).
4. Guidelines for pre-clinical trials of medicinal products. Part One / ed. A.N. Mironov. M.: Grif and K, 2012. 944 p. (in Russ.).
5. Burlyayeva E.V., Mironova N.A. Functional modeling production of the new third-generation photosensitizer for photodynamic therapy of cancer // *Vestnik MITHT (Fine Chemical Technologies)*. 2013. V. 8. № 2. P. 95–100. (in Russ.).
6. Kharbiev R.U. Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. M.: Meditsina Publ., 2005. 832 p. (in Russ.).
7. Chomezynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Analyt. Biochem.* 1987. V. 162. P. 156–159.
8. Gelder C.M., Thomas P.S., Yates D.H., Adcock I.M., Morrison J.F.J., Barnes P. Cytokine expression in normal, atopic and asthmatic subject using the combination of sputum induction and the polymerase chain reaction // *Thorax.* 1995. V. 50. P. 1033–1037.
9. Burlyayev V.V., Davydenko A.A. Inductive inference at the information system for predicting an antitumor effect of targeted immunotherapy agents // *Informatsionnye i telekommunikatsionnye tekhnologii (Information and Telecommunication*

10. Бурляев В.В., Давыденко А.А., Николаева О.М., Руссу Л.И., Мезенцева М.В. Прогностическая модель противоопухолевого эффекта таргетных препаратов иммунотерапии // Тонкие хим. технологии. 2016. № 4. С. 69–74.

Technologies). 2016. № 29. P. 3–8. (in Russ.).

10. Burlyayev V.V., Davydenko A.A., Nikolaeva O.M., Russu L.I., Mezentseva M.V. Prognostic model antitumor effect of targeted therapies immunotherapies // Tonkie khimicheskie tekhnologii (Fine Chemical Technologies). 2016. № 4. P. 69–74. (in Russ.).

Об авторах:

Бурляев Валерий Викторович, кандидат технических наук, профессор кафедры информационных систем в химической технологии Института тонких химических технологий ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86).

Давыденко Андрей Александрович, аспирант кафедры информационных систем в химической технологии Института тонких химических технологий ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86).

Корнюшко Валерий Федорович, доктор технических наук, заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры информационных систем в химической технологии Института тонких химических технологий ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86).

Руссу Леонид Иванович, научный сотрудник лаборатории культур тканей ФГБУ ФНИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18).

Мезенцева Марина Владимировна, доктор биологических наук, руководитель лаборатории культур тканей ФГБУ ФНИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18).