



ISSN 1726-9784



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



Russian Journal
of Biotherapy

1/2013

ISSN 1726-9784

РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№1 Том 12 2013 г.

УДК 616-085.2/.3

Учредители

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН; НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей

Главный редактор

А.Ю. Барышников, д-р мед. наук, проф.

Заместители главного редактора

А.В. Караулов, чл.-корр. РАМН, д-р мед. наук, проф.; Н.А. Оборотова, д-р фарм. наук, проф.

Редколлегия

М.А. Барышникова, канд. фарм. наук (отв. секретарь),
О.А. Бочарова, д-р биол. наук, проф. (Москва),
А.К. Голенков, д-р мед. наук, проф. (Москва), Л.В. Демидов, д-р мед. наук, проф. (Москва),
И.В. Евсегнеева, д-р. мед. наук, проф. (Москва), П.К. Иванов, д-р мед. наук (Москва),
З.Г. Кадагидзе, д-р мед. наук, проф. (Москва), И.Ю. Кубасова, канд. мед. наук (Москва),
В.В. Новиков, д-р биол. наук, проф. (Нижний Новгород), В.В. Решетникова, канд. техн. наук (Москва)
Н.С. Сергеева, д-р мед. наук, проф. (Москва), Е.В. Степанова, д-р мед. наук (Москва),
Н.Н. Тупицын, д-р мед. наук, проф. (Москва), Е.Г. Турнянская, канд. мед. наук (Москва),
С.А. Тюляндин, д-р мед. наук, проф. (Москва), Ю.В. Шишкин, д-р мед. наук, проф. (Москва),
И.Ж. Шубина, канд. биол. наук (Москва), Р.И. Якубовская, д-р мед. наук, проф. (Москва)

Редакционный совет

Н.П. Бочков, академик РАМН, д-р мед. наук, проф. (Москва), А.М. Гарин, д-р мед. наук, проф. (Москва),
Г.П. Георгиев, академик РАН, д-р биол. наук, проф. (Москва),
М.Л. Гершанович, д-р мед. наук, проф. (Санкт-Петербург),
М.И. Давыдов, академик РАН и РАМН, д-р мед. наук, проф. (Москва),
М.Р. Личиницер, академик РАН, д-р мед. наук, проф. (Москва),
В.А. Тутьян, академик РАМН, д-р мед. наук, проф. (Москва),
В.И. Чиссов, академик РАМН, д-р мед. наук, проф. (Москва)

«Российский биотерапевтический журнал» является рецензируемым изданием

Зарегистрировано в Государственном Комитете Российской Федерации по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций

Регистрационный номер:

ПИ №77-53039 от 04.03.2013 г.

Почтовый адрес:

115478 Москва, Каширское ш., 24
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН
НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей
Тел.: +7 (499) 323 57 00, +7 (499) 324 10 65; факс: +7 (499) 324 22 74;
E-mail: biotherapy_rbi@mail.ru
Интернет-версия: www.ronc.ru/1915

Подписной индекс 81679

Объем 3.75 усл.-печ. листов,
подписано в печать 31.03.2013
Тираж 1000 экз.

Издательская группа РОНЦ:

115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24.

Тел. +7 (499) 324 24 70; ronc@list.ru

Координаторы: Е.Г. Турнянская, Б.Б. Крюков (макет)

Принт-менеджмент:

«Практическая медицина»

Тел.: +7 (495) 981-91-03

www.medprint.ru

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

<i>А.Л. Чернышова, Л.А. Коломиец, Н.В. Юнусова, И.В. Кондакова, А.А. Буланова, Е.В. Шаншавили</i> ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ НЕОБХОДИМОСТИ КОРРЕКЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА У БОЛЬНЫХ С ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ И РАКОМ ЭНДОМЕТРИЯ	3
--	---

<i>М.А. Барышников, М.Т. Зангиева, А.Ю. Барышников</i> ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИПИДНЫХ НАНОКАПСУЛ С КЛЕТКОЙ	11
---	----

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>С.С. Шушанов, Т.А. Кравцова, А.А. Ставровская</i> IGF-1-ЗАВИСИМАЯ ЭКСПРЕССИЯ МРНК ГЕНА <i>MRP1</i> И <i>LRP</i> В ЛИНИЯХ КЛЕТОК МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА	17
---	----

<i>О.В. Уткин, Н.А. Сахарнов, Н.Б. Преснякова, Д.В. Новиков А.В. Алясова, В.В. Новиков, А.Ю. Барышников</i> ЭКСПРЕССИЯ CD95/FAS В КЛЕТКАХ КРОВИ ПРИ РАКЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ	23
--	----

<i>Т.А. Митина, А.К. Голенков, А.Ю. Барышников, А.В. Караулов, Е.В. Трифонова, Ю.Б. Черных, Е.В. Катаева, Т.Д. Луцкая, Л.Л. Высоцкая, Г.А. Дудина, С.Г. Захаров, А.М. Фомин, Н.В. Любимова, И.Н. Козарко</i> КИНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСТАТОЧНОЙ ОПУХОЛИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ НА ОСНОВНИИ АНАЛИЗА СВОБОДНЫХ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ	31
---	----

<i>Д.К. Кенбаева, А.Ф. Лазарев</i> ЧИСЛЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА В ХОДЕ ИММУНОТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ	37
--	----

<i>Е.В. Моисеева, Н.Р. Кузнецова, Д.А. Аронов, Н.С. Ситников, А.Ю. Федоров, Н.В. Бовин, Е.Л. Водовозова</i> ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛИПОСОМ С ЛИПОФИЛЬНЫМ ПРОЛЕКАРСТВОМ КОМБРЕТАСТАТИНА А4 НА МОДЕЛИ ОСТРОГО Т-ЛИМФОЛЕЙКОЗА МЫШЕЙ	41
--	----

<i>Р.Н. Белоногов, Н.М. Титова, А.А. Савченко</i> ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТИОЛОВОГО ГОМЕОСТАЗА В ЭРИТРОЦИТАХ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ	47
---	----

<i>М.А. Сеньчукова, А.А. Стадников, Д.А. Боков</i> КАНЦЕРОГЕННЫЙ ЭФФЕКТ СМЕСИ ФОРМАЛЬДЕГИДА И ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА ПРИ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ВВЕДЕНИИ КРЫСАМ	51
--	----

<i>А.П. Дмитренко, Б.М. Зайдинер</i> ВЛИЯНИЕ ЭКСЦИЗИОННОЙ БИОПСИИ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	55
---	----

К 60-летию Александра Викторовича Караулова	58
--	----

Правила оформления статей	16; 30; 57
--	------------

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

УДК: 618.145-007.61+618.145-006.6]-008.6

А.Л. Чернышова, Л.А. Коломиец, Н.В. Юнусова, И.В. Кондакова, А.А. Буланова, Е.В. Шаншашвили

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ НЕОБХОДИМОСТИ
КОРРЕКЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА
У БОЛЬНЫХ С ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ И РАКОМ ЭНДОМЕТРИЯ**
ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН, Томск

Контактная информация*Чернышова Алена Леонидовна, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник отделения гинекологии***адрес:** Томск, пер. Кооперативный, 5; **тел.** +7(913)824-60-72, +7 (3822)41-80-83**e-mail:** alacher@list.ru

Статья поступила 18.01.2013, принята к печати 01.02.2013.

Резюме

Представлена проблема метаболической коррекции гормонально-метаболических нарушений у больных ГПЭ и РЭ в сочетании с метаболическим синдромом. Можно предположить, что наряду с традиционным лечением, метаболическая коррекция, проводимая у больных с ГПЭ и РЭ на фоне метаболического синдрома, будет способствовать снижению риска последующего рецидивирования РЭ. В этом плане эффективна разработка как методов прогнозирования течения ГПЭ на фоне метаболического синдрома, так и вариантов метаболической реабилитации таких больных.

Ключевые слова: метаболическая реабилитация, рак эндометрия, гиперпластические процессы эндометрия, метаболический синдром.

A.L. Chernyshova, L.A. Kolomiets, N.V. Yunusova, I.V. Kondakova, A.A. Bulanova, E.V. Shanshashvili

**PATHOGENETIC FOUNDATION
OF METABOLIC SYNDROME CORRECTION
IN PATIENTS WITH ENDOMETRIAL HYPERPLASIA AND ENDOMETRIAL CANCER**
Research Institute of Oncology, Tomsk

Abstract

The literature review deals with the problem of metabolic correction of hormonal-metabolic disturbances in patients with EH and EC with the evidence of metabolic syndrome. Metabolic correction together with conventional treatment in EH patients with metabolic syndrome is expected to contribute to the reduction in the risk of EC development. The development of new methods for predicting EC outcome as well as options for metabolic rehabilitation of these patients is required.

Key words: metabolic rehabilitation, endometrial cancer, endometrial hyperplasia, metabolic syndrome.

Введение

В течение последних двух десятилетий во всем мире отмечается отчетливая тенденция к увеличению частоты развития гормонозависимых опухолей, что, в первую очередь, относится к раку эндометрия (РЭ) [26]. Заболеваемость раком эндометрия в России увеличилась в 2 раза и составляет 28,5 случая на 100 тыс. населения [27; 35]. Согласно современным представлениям метаболический синдром является независимым фактором риска развития гиперпластических процессов и рака эндометрия, что обусловлено рядом патогенетических механизмов [7]. В проведенных ранее нами исследованиях выявлено, что рак эндометрия в сочетании с метаболическим синдромом встречается в 82,6 % случаев, что согласно теории Я.В. Бохман, соответствует I патогенетическому варианту рака эндометрия (гормонозависимому) [23; 34]. Высокая частота гиперпластических процессов и рака эндометрия у женщин на фоне метаболического синдрома диктует необходимость изучения патогенетических механизмов и особенностей клинического течения заболеваний эндометрия на фоне гормонально-метаболических нарушений. Больные с ме-

таболическим синдромом, в большей степени, чем в популяции в целом, предрасположены к развитию злокачественных новообразований [15]. При этом по данным ряда авторов, риск возникновения рака эндометрия в условиях метаболического синдрома возрастает в 2–3 раза [1; 19]. Кроме того, необходимо отметить, что у больных с метаболическим синдромом повышается риск развития не только рака эндометрия, но и таких злокачественных новообразований, как гепатоцеллюлярная карцинома, рак поджелудочной железы, рак почки, рак молочной железы [38; 42–44]. При этом повышается риск возникновения первично-множественных злокачественных новообразований, прежде всего сочетание типа «несемейного» рака эндометрия с раком молочной железы, яичников, толстой кишки [6; 8].

Критерии метаболического синдрома

МС в настоящее время является актуальной медико-социальной проблемой в мире. Это обусловлено широким распространением данного симптомокомплекса в популяции [2; 14]. На I Международном конгрессе по предиабету и МС (Берлин, 2005 г.), оценивая результаты национальных исследований, австралийский ученый Поль Зиммет на-

звал МС пандемией XXI века. Предполагается, что 25–35 % населения в России, западных странах страдают от метаболического синдрома. В возрасте старше 60 лет доля лиц с МС составляет приблизительно 43 % [3; 6].

Следует также отметить, что МС является одним из ведущих факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, нарушений углеводного обмена, патологии репродуктивной системы. Это приводит к тяжелым сопутствующим заболеваниям, снижению трудоспособности и сокращению продолжительности жизни больных [11; 46].

В 1998 г. рабочая группа ВОЗ составляющими компонентами МС признала следующий симптомокомплекс: висцеральное (абдоминальное) ожирение, инсулинорезистентность, гиперинсулинемия, нарушение толерантности к глюкозе или ИНСД, артериальная гипертензия, дислипидемия, нарушения гемостаза, гиперурикемия, микроальбуминурия.

В настоящее время понятие МС расширяется. В него стали включать гиперандрогению у женщин, гиперлептинемия, лептинорезистентность, гипертрофию миокарда, повышение уровня свободных жирных кислот в крови, синдром апноэ во сне, активизацию симпатической нервной системы, наличие оксидативного стресса, провоспалительный статус, протромботический статус: повышение содержания фибриногена в крови, увеличение адгезивной и агрегационной способности тромбоцитов, повышение активности ингибитора активатора плазминогена-1 (РАИ-1) [24]. В начале 90-х годов появились данные о метаболических нарушениях у женщин, страдающих СПКЯ. Речь идет о развитии гипергликемии, дислипидемии, гипертензии и связанных с ними таких заболеваний, как ИНСД и сердечно-сосудистые заболевания [31]. Причем эти заболевания у женщин с СПКЯ манифестируют в относительно молодом возрасте. В частности, было показано, что СПКЯ часто сопутствует инсулинорезистентность и как следствие – компенсаторная гиперинсулинемия независимо от массы тела [5].

Ранее существующие критерии постановки диагноза МС, предложенные ВОЗ, экспертами образовательной программы США по холестерину, Американской ассоциацией эндокринологов, несколько отличались друг от друга в перечне комплекса симптомов МС и показателях. В апреле 2005 г. IDF определила единые критерии постановки диагноза «метаболический синдром» [34]. Согласно рекомендациям IDF обязательным критерием МС является центральное (абдоминальное) ожирение (окружность талии более 94 см для мужчин и более 80 см для женщин – у европеоидной расы) в сочетании как минимум с двумя из следующих 4 факторов:

- повышение ТГ более 1,7 ммоль/л или специфическое лечение дислипидемии;
- снижение ЛПВП менее 1,03 ммоль/л у мужчин и менее 1,29 ммоль/л у женщин или специфическое лечение;
- повышение АД: систолического (САД) более 130 мм рт. ст. или ДАД более 85 мм рт. ст. или антигипертензивная терапия;
- повышение глюкозы венозной плазмы натощак более 5,6 ммоль/л или ранее выявленный СД2.

Помимо исследования основных диагностических критериев, IDF consensus group рекомендует – исследование дополнительных метаболических параметров, ассоциированных с МС, включающие: оценка нарушения распределения жировой ткани (распределение общего жира, распределение цен-

трального жира, биомаркеры жировой ткани: лептин, адипонектин, содержание жира в печени); атерогенная дислипидемия (апопротеин В, не-ЛПВП, мелкие частицы липопротеидов низкой плотности), дисгликемия (ОГТТ); инсулинорезистентность (уровень инсулина/проинсулина натощак, НОМА-IR, IP по минимальной модели Бергмана, повышенные свободных жирных кислот (натощак и при ОГТТ), М-объем (клэмп-метод)); сосудистые нарушения, связанные с повышением АД (исследование эндотелиальной дисфункции, микроальбуминурия); провоспалительный статус (повышенный С-реактивный белок, повышенные воспалительные цитокины – фактор некроза опухолей, интерлейкин 6); протромботический статус (фибринолитические факторы (тканевый активатор плазминогена и т.д.), факторы свертывания (фибриноген и т.д.). Исследование этих факторов позволит со временем модифицировать диагностические критерии МС, а также предоставит дополнительные клинические данные по различным этническим группам [18].

Манифестным звеном патогенеза метаболического синдрома, по мнению большинства исследователей, является первичная инсулинорезистентность и компенсаторная гиперинсулинемия. Инсулинорезистентность – это снижение биологического эффекта инсулина. Развивающаяся компенсаторная гиперинсулинемия, с одной стороны, вначале поддерживает углеводный обмен в норме, с другой – индуцирует развитие метаболических, гемодинамических и органных нарушений, приводящих в итоге к возникновению сахарного диабета типа 2 и сердечно-сосудистых заболеваний. В пользу ведущей роли инсулинорезистентности в развитии метаболического синдрома и отдельных его компонентов свидетельствуют результаты популяционных исследований, проведенных в ряде стран [38; 41]. Было выявлено, что инсулинорезистентность имела у 58 % обследованных с артериальной гипертензией, у 84 % – с гипертриглицеридемией, у 42 % – с гиперхолестеринемией, у 66 % – с нарушениями к толерантности к глюкозе, у 95 % – с метаболическим синдромом. Большой толчок в развитии абдоминально-висцерального ожирения и инсулинорезистентности привносят гормональные нарушения, возникающие особенно на этапе формирования менопаузального гомеостаза. Развивающийся гормональный дисбаланс способствует накоплению жира в висцеральных депо и развитию и прогрессированию инсулинорезистентности. С увеличением общей жировой массы тела резко возрастает тканевой синтез эстронов и его метаболитов. Причем, нарушение секреции половых гормонов сопряжено со значительным увеличением продукции гонадотропинов и выраженным дефицитом гормона роста. При абдоминальном ожирении нарушается и периферический метаболизм кортикостероидов: увеличивается метаболический клиренс кортизола. В адипоцитах сальника вследствие повышения активности 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы ускоряется превращение неактивного кортизола в кортизол, который оказывает местное действие, стимулируя адипогенез в висцеральных депо [13].

Метаболический синдром: взаимосвязь с состоянием репродуктивной системы

Известно, что жировая ткань выполняет не только традиционные физиологические функции, направленные на сохранение энергии, регуляцию теплообмена и защиту, но и является своеобразной эндокринной железой, клетки которой – адипоциты, активно секретирующие разные гормоны (леп-

тин, резистин, адипонектин и др.), и цитокины (фактор некроза опухоли, интерлейкин-6, интерлейкин-8 и др.), регулируют ряд физиологических процессов [22; 28]. Кроме того, в настоящее время ожирение рассматривается в качестве одной из основных причин нарушений функции репродуктивной системы у женщин. Роль ожирения в генезе репродуктивной дисфункции была доказана во многих исследованиях [37].

О тесной взаимосвязи количества жировой ткани и функционирования репродуктивной системы свидетельствует тот факт, что масса тела является критическим фактором, регулирующим половое развитие [9]. У девочек с ожирением наблюдается более раннее наступление первой менструации, имеется риск преждевременного полового созревания. Объем жировой ткани определяет возраст наступления первой менструации [17]. Если происходит чрезмерное уменьшение количества жировой ткани и возникает дефицит массы тела (в результате физических нагрузок или нарушения режима питания), возможно исчезновение самостоятельных менструаций, т.е. развитие аменореи [33]. Механизмы влияния жировой ткани на репродуктивную функцию в настоящее время не получили однозначной трактовки [36].

Известно, что одним из основных гормонов жировой ткани является лептин, который играет ключевую роль в гомеостазе энергии, сигнализируя головному мозгу о запасах энергии [8; 29]. У больных с ожирением отмечается повышение уровня этого гормона, которое не сопровождается развитием ожидаемого эффекта (снижением потребления пищи и увеличением затрат энергии). Так нарушение функции лептина и резистина сопряжено со значительным увеличением секреции инсулина поджелудочной железой. При этом снижается биологическое действие инсулина, развивается ИР, что ведет к развитию сахарного диабета второго типа [10]. Нарушение биосинтеза и секреции лептина, а также утрата им способности оказывать биологическое действие могут вызывать репродуктивную дисфункцию. Избыток лептина может оказывать негативное влияние на выработку гонадотропинов, в результате чего подавляется созревание доминантного фолликула в яичниках и блокируется овуляция [21].

Известно, что увеличение массы жировой ткани выше нормы на 20 % и более приводит к нарушениям функции гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы [25]. Ожирение, особенно андронного типа, является одним из главных факторов риска развития яичниковой гиперандрогении, при этом более чем у 1/3 женщин может сформироваться СПКЯ. СПКЯ является основной причиной нерегулярного ритма менструаций, эндокринного бесплодия, гирсутизма, алопеции, себореи и акне, развития гиперпластических изменений в эндометрии [3]. Возникновению поликистозных яичников при ожирении, с одной стороны, может способствовать усиленное превращение эстрогенов в андрогены в стромальных клетках жировой ткани, что сопровождается возникновением гиперандрогении [20]. С другой стороны, при ожирении развиваются инсулинорезистентность и компенсаторная гиперинсулинемия. Как известно, инсулин не только регулирует уровень глюкозы в сыворотке крови, но и оказывает многочисленные эффекты на функцию гипоталамо-яичниковой системы [45]. Под его влиянием усиливается стероидогенез в яичниках (в меньшей степени – в надпочечниках), соответственно, увеличивается продукция мужских половых гормонов. Избыточное количество инсулина, характерное для женщин с ожирением,

блокирует выработку в печени белков, связывающих половые стероидные гормоны [47]. Вследствие этого увеличивается уровень биологически активных фракций андрогенов, способных усиливать рост волос, что приводит к гирсутизму [28].

Частота нарушений менструальной функции у женщин с избыточной массой тела достигает 70 %. Основой для их формирования служат хроническая ановуляция, яичниковая гиперандрогения, часто приводящая к формированию синдрома поликистозных яичников, а развивающаяся на этом фоне гиперэстрогения – к пролиферативным процессам эндометрия [23].

В норме около 95–97 % половых стероидов находится в связанном состоянии в комплексе с глобулином, связывающим половые стероиды ПССГ [7]. В условиях гиперинсулинемии, являющейся результатом инсулинорезистентности, в печени снижается синтез белков-переносчиков гормонов, в частности ПССГ, а также белков, связывающих инсулиноподобные факторы роста (ИФР). В результате в крови увеличиваются биологически доступные фракции андрогенов, в основном тестостерона, эстрадиола, ИФР, что приводит к повышению их биологического воздействия на органы и ткани [22].

Обладая сродством к рецепторам ИФР I типа, инсулин, совместно с ИФР-I, в клетках теки и стромы яичников способствует усилению ЛГ – зависимого синтеза андрогенов в яичниках, повышая активность цитохрома P-450c17a, основного регулятора андрогенеза в яичниках и надпочечниках [37]. Повышенные уровни свободного тестостерона и андростендиона, активация андрогенеза в яичниках приводят к атрезии фолликулов, способствуя развитию хронической ановуляции [34].

Помимо накопления стероидных гормонов, в жировой ткани идет активная их конверсия. Под действием ароматазы жировой ткани происходит превращение андрогенов в эстрогены, главным образом андростендиона в эстрон. Если у женщин с нормальной массой тела лишь около 1% андростендиона конвертируется в эстрон, то при ожирении его конверсия увеличивается в 10 раз [5].

Таким образом, при метаболическом синдроме, особенно при абдоминальном фенотипе ожирения, за счет повышения концентрации эстрогена и фракции биодоступного эстрадиола развивается относительная гиперэстрогения [6]. Длительная гиперэстрогения при дефиците прогестерона и отсутствии его нормальной секреторной трансформации способствует развитию пролиферативных процессов в эндометрии [10]. В то же время под воздействием повышенных концентраций эстрогена в эндометрии увеличивается экспрессия ИФР-I, а пониженный уровень связывающих белков увеличивает биодоступность этого фактора роста. Инсулин и ИФР-I способны напрямую, без участия эстрогенов, стимулировать пролиферацию эндометрия [32]. Кроме того, и ИФР-I, и эстрогены могут одновременно активировать ранние ответы некоторых онкогенов, участвующих в регуляции клеточного роста, что указывает на синергизм их действия в индукции клеточной пролиферации. Таким образом, ИФР-I поддерживает эстрогензависимую пролиферацию, а в условиях гиперэстрогении участвует в формировании пролиферативных процессов в эндометрии [23].

Рак эндометрия на фоне метаболического синдрома: факторы риска и прогноза

ГПЭ, являясь пролиферативными заболеваниями, при длительном их течении и частом реци-

дивировании, особенно в сочетании с метаболическим синдромом, могут быть фоном, на котором возможно развитие злокачественного поражения. Нами ранее был проведен анализ факторов риска развития РЭ у больных с ГПЭ на фоне метаболического синдрома с построением формулы для оценки индивидуального риска. При анализе наиболее информативных показателей, вошедших в дискриминантную модель, оказалось, что наряду с некоторыми антропометрическими параметрами (обхват талии и бедер, сагитальный диаметр) для этой группы больных значимыми оказались некоторые клиничко-анамнестические параметры: возраст, возраст появления вторичных половых признаков, масса пациентки при рождении, вид вскармливания [34]. Известно, что риск развития РЭ повышается с возрастом [7], однако у больных ГПЭ с метаболическим синдромом это параметр должен интерпретироваться, по-видимому, только во взаимосвязи с другими важными известными факторами риска, так как значительная часть больных с атипичной гиперплазией эндометрия и метаболическим синдромом в репродуктивном возрасте имеет значительный риск развития РЭ, особенно при наличии бесплодия [33]. При определении факторов, формирующихся внутриутробно и создающих предрасположенность к возникновению РЭ выделяют большую массу тела при рождении, искусственное вскармливание, более поздний возраст появления вторичных половых признаков [23].

Можно предположить, что избыточные метаболические сигналы (гипергликемия, гиперинсулинемия) во время беременности являются одним из стимулов к прибавке массы на ранних этапах жизни. Принято считать, что гипергликемия у матери во время беременности приводит к гиперинсулинемии у плода. Повышение секреции инсулина является одной из причин увеличения массы новорожденного в связи с усилением липосинтеза и жиросотложения. Большая, чем в норме, масса плода сочетается, как правило, с усилением эстрогенообразования и более высокой гиперэстрогемией во время беременности, а у женщин, родившихся с массой свыше 4000 г., в возрасте 15–30 лет имеется тенденция к более высокой инсулинемии в глюкозотолерантном тесте, а в случае раннего менархе – к более высокой концентрации в крови свободного эстрадиола [8; 34]. В свою очередь известно, что гиперэстрогемия является значимым фактором риска развития РЭ [5]. Кроме того, одним из важных моментов в развитии метаболических нарушений является характер вскармливания. Искусственное вскармливание, как известно, в большинстве случаев вызывает нарушения углеводного и липидного обмена в условиях сниженного иммунитета [6]. Вошедшие в уравнение дискриминантной функции гормонально-метаболические показатели (ХС-ЛПНП, лептин, тестостерон, прогестерон, уровень гликемии натощак) демонстрируют широкий спектр соответствующих нарушений, выраженных в наибольшей степени у больных РЭ с метаболическим синдромом. Наряду с другими показателями уровень экспрессии PTEN явился значимым признаком, что согласуется с данными ряда авторов о наличии данного белка в большинстве случаев в гиперплазированном эндометрии и о постепенной утрате экспрессии этого онкосупрессора, в значительной степени блокирующего проведение сигнала с активированного рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 типа, преимущественно в эндометриодных карциномах [39].

Выявлено, что факторы, ассоциированные с метаболическим синдромом, такие как гиперинсулинемия, избыток ИФР, недостаток экспрессии белков, связывающих ИФР, гиперлептинемия, гиперлипидемия, сочетающиеся часто с гиперэстрогемией, способны оказывать модифицирующее воздействие на прогноз больных РЭ через связь с глубиной инвазии опухоли в миометрий и распространением опухоли на цервикальный канал [9; 34]. Полученные собственные данные предварительных исследований выявили, что уровень ИФР-I, основного белка связывающего ИФР (IGFBP-3) и протеиназы IGFBP-4 и -5 - RAPP-A в опухолях эндометрия достоверно выше по сравнению с гиперплазированным эндометрием с максимальными значениями показателей у больных РЭ с метаболическим синдромом. Уровень ИФР-I и RAPP-A в опухолях эндометрия зависел от экспрессии рецепторов стероидных гормонов и онкосупрессора PTEN и был значительно выше в PTEN-негативных и рецептор-положительных опухолях. Полученные данные представляют значительный интерес, поскольку PTEN подавляет антиапоптозные эффекты фосфоинозитол-3 киназа/серин-треонин протеинкиназа/Akt сигнального пути, который активируется в клетке при связывании рецептора ИФР со своими лигандами. Получены данные о взаимосвязи между уровнем основного белка, связывающего ИФР – IGFBP-3 – у больных РЭ с метаболическим синдромом и уровнем лептина, инсулина и глюкозы в сыворотке крови, что, возможно, свидетельствует о наличии регуляции внутриопухолевого уровня IGFBP-3 лептином, инсулином и глюкозой [39].

Анализ наиболее значимых факторов, вошедших в дискриминантные прогностические модели для больных РЭ с метаболическим синдромом и без метаболических нарушений, показал, что статистически значимым фактором в обеих моделях является уровень металлопротеиназы RAPP-A в опухоли. Исследования показали, данный белок обладает свойствами специфической протеиназы IGFBP-4 и -5, секретируется не только клетками трофобласта, но и обнаруживается в фолликулярной жидкости, в семенной и простатической жидкости, продуцируется стромальными клетками нормального, гиперплазированного и малигнизированного эндометрия, а также рядом опухолей эпителиального происхождения [34]. Причем в малигнизированном эндометрии уровень экспрессии RAPP-A был значительно выше по сравнению с гиперплазированным (иммуногистохимическое исследование) [23], что созвучно полученным нами данным. В тоже время результаты нашего исследования показали, что в части опухолей RAPP-A не продуцируется. В плане прогноза в обеих группах высокий уровень RAPP-A в опухоли ассоциировался с неблагоприятным прогнозом. Учитывая полученные результаты и имеющиеся данные литературы можно предположить, что больные с ГПЭ и РЭ с метаболическим синдромом имеют собственные факторы прогноза, отличные от общей группы больных и ассоциированные с системой инсулиноподобных факторов роста.

Современные методы коррекции метаболического синдрома у больных с гиперпластическими процессами эндометрия

Известно, что риск опухолевой трансформации ГПЭ возрастает в 7–9 раз при различных метаболических нарушениях гормонального обмена в

организме [32]. Вместе с тем нет единой точки зрения на вопрос, каким образом рассматривать в данном контексте метаболический синдром – как один из многих известных модифицирующих факторов риска или как фундамент (основа), на котором формируются ГПЭ, которые при определенных условиях переходят в рак. Традиционные методы лечения ГПЭ, в том числе и ГПЭ на фоне метаболического синдрома не включают коррекцию метаболических нарушений [31]. Однако имеются примеры регрессии атипичной эндометриальной гиперплазии, резистентной к прогестинам, у больных в сочетании с диабетом, инсулинорезистентностью, синдромом поликистозных яичников и бесплодием при терапии метформином или метформином в сочетании с оральными контрацептивами [23]. Можно предположить, что метаболическая коррекция гормонально-метаболических нарушений у больных ГПЭ в сочетании с метаболическим синдромом и высоким риском развития РЭ будет способствовать снижению риска развития РЭ. В этом плане эффективна разработка как методов прогнозирования течения ГПЭ на фоне метаболического синдрома, так и вариантов метаболической реабилитации таких больных.

**Современные подходы
к метаболической реабилитации больных
раком эндометрия**

Возможность лечения и коррекции метаболического синдрома (а так же отдельных составляющих этого синдрома) представлена во многих исследованиях. В коррекции метаболического синдрома важное место занимает изменение образа жизни – соблюдение диеты и выполнение умеренных физических упражнений. В литературе имеются данные трех крупных исследований (Da Qing study, 2008; DPP, 2009; FDP, 2005), которые показали, что изменение образа жизни у лиц с метаболическими нарушениями в течение 3 лет снижает риск развития осложнений МС почти на 58 % [3]. Доказано, что систематическое соблюдение диеты и выполнение физической нагрузки (снижение массы тела на 5 %, ограничение жиров в суточном рационе и насыщенных жирных кислот, увеличение доли приема клетчатки, физическая нагрузка не менее 30 мин в день) с продолжительностью не менее 3–6 мес приводит к достоверному снижению массы тела на 11%, окружности талии – на 9%, уровня холестерина ЛПНП – на 13% и триглицеридов – на 24%; это сочетается с улучшением инсулиночувствительности – на 15% [4].

Но несмотря на то, что в последние годы существенно изменились принципы лечения метаболического синдрома, ни один из многочисленных предлагаемых способов терапии не обеспечивает длительного успеха [4,12]. По крайней мере, не менее чем у 90% пациенток исходная масса тела восстанавливается в течение первого года после окончания диетотерапии [18]. Именно поэтому в литературе данное обстоятельство называется «weight cycling» (круговорот веса тела) [30]. В лечении основного компонента МС – ожирения наиболее эффективным способом является сочетание диетотерапии, повышение физической нагрузки и поведенческой терапии, при условии длительного наблюдения и поддержки со стороны медицинских работников [40].

В этом плане весьма перспективными средствами лечения метаболического синдрома представляются диеты, в которых делается акцент на полезных для здоровья продуктах, в частности дие-

ты DASH и средиземноморская. Эти диеты богаты фруктами, овощами и клетчаткой, содержат мало насыщенных жиров и могут включать много мононенасыщенных жиров. В рамках программ по снижению веса такой рацион позволит устранить многие факторы риска метаболического синдрома, включая инсулинорезистентность и воспаление. Хороший положительный эффект имеется при присоединении физических нагрузок, который обусловлен повышением чувствительности к инсулину, снижением уровня глюкозы в крови. При этом доказано, что улучшение чувствительности к инсулину зависит от степени физических нагрузок: чем выше эти нагрузки, тем больше эффект. Кроме того, выявлено, что физическая активность, даже в отсутствие снижения веса, способствует уменьшению жировых отложений в клетчатке внутренних органов и в подкожной клетчатке живота. Важным моментом является необходимость индивидуального подхода к выбору объема (частота, длительность по времени) и типа (статический, динамический) физических упражнений.

Отмечается, что наиболее значимым медицинским последствием ожирения является сахарный диабет второго типа, так как ожирение является важнейшим среди ведущих факторов риска развития сахарного диабета [14].

При этом следует отметить определенные особенности метаболического синдрома у больных РЭ. Больные РЭ – соматически отягощенный контингент больных с длительным анамнезом по гипертонической болезни и сахарному диабету. Причем более 40 % больных РЭ получают, как правило, до установки основного диагноза систематическую антигипертензивную терапию, а 14 % – антидиабетическое лечение [18]. Частота встречаемости диабета у всех больных РЭ по данным литературы составила от 1,3 до 22 %, причем отмечается, что при проведении теста на толерантность глюкозе у 72 % больных РЭ выявляется нарушения толерантности к глюкозе, что созвучно и нашим собственным данным [19]. Закономерно, что у больных РЭ в сочетании с метаболическим синдромом эти нарушения выявляются еще чаще, причем нарушение толерантности к глюкозе превалирует.

В этом аспекте необходимо отметить многочисленные многоцентровые исследования по предупреждению развития сахарного диабета второго типа у больных с ожирением и нарушением толерантности к глюкозе, в абсолютном большинстве которых было показано, что интенсивное изменение стиля жизни (диетотерапия, повышение физической активности) или изменение стиля жизни в сочетании некоторыми антидиабетическими и весоредуцирующими препаратами (метформин, акарбоза, троглитазон, орлистат) при их длительном использовании (не менее года) более чем на 25 % снижает риск возникновения сахарного диабета 2 типа и даже смертность от осложнений диабета. Причем четко показано, что средством повышения действенности лечения ожирения является фармакотерапия, которая помогает более интенсивно снижать массу тела, предотвращает развитие рецидивов, улучшает метаболические показатели и закрепляет приверженность больных лечению [32].

В ряде исследований показано, что возможна коррекция метаболических нарушений в составе комплексной терапии как у больных ГПЭ в плане профилактики РЭ, так и у больных РЭ в плане повышения качества жизни и снижения неассоциированной с основным заболеванием летальности. Уникальной осо-

бенностью РЭ является то, что эти больные как правило страдают ожирением, ожирение явилось значимым фактором риска развития РЭ у этих больных и эти больные как правило не предпринимают никаких усилий по изменению стиля жизни и борьбой с ожирением после установки диагноза. Показано, что интервенционные программы по изменению образа жизни (гипокалорийная диета, физические нагрузки, формирование ограничительного типа пищевого поведения) у больных РЭ с ожирением возможны и достаточно эффективны, высока приверженность больных такому лечению [16]. Интересно отметить, что даже у значительной части соматически здоровых женщин с ожирением имеются психо-эмоциональные нарушения (тревога, депрессии, тревожно-депрессивные нарушения, ипохондрия) и нарушение пищевого поведения [30]. У больных РЭ с ожирением, ведущих обычный для себя образ жизни после проведенного лечения, качество жизни обычно не страдает, однако со временем статистически значимо по сравнению с больными РЭ, изменившими стиль жизни (питание, физические нагрузки), возрастает количество депрессий [24]. Результаты 12-месячного рандомизированного интервенционного исследования по изменению стиля жизни у тучных больных РЭ I–II стадии показали, что хотя в целом данная интервенция не влияла на глобальное качество жизни, однако у похудевших пациентов статистически значимо повысилась самоэффективность (психологический термин, означающий убеждение человека, что в сложных ситуациях он сможет действовать активно, вера в эффективность собственных действий), эмоциональное здоровье, изменился тип пищевого поведения с преобладанием самоограничительного варианта. Однако у успешно похудевших больных РЭ частота эпизодов дисингибирования (растормаживания) – т.е. количество эпизодов потери контроля над питанием вследствие дисингибиторов (стресс, изменение настроения, алкоголь) была выше, чем у пациентов, набравших вес, что диктует необходимость пристального изучения данного феномена [21].

Известно еще одно исследование по изучению ассоциации качества жизни у больных РЭ в зависимости от индекса массы тела и уровня физической нагрузки (физических упражнений). Выявлено, что женщины, регулярно встречающиеся со специалистами здравоохранения по вопросам снижения веса, выполнения физических упражнений по сравнению с женщинами, не получающими такой помощи, имеют более высокий уровень качества жизни. Многофакторный регрессионный анализ выявил, что у больных РЭ как уровень выполнения физических упражнений, так и значения индекса массы тела явились факторами, ассоциированными с качеством жизни [47]. Результаты данных исследований наглядно демонстрируют существенную роль врача-онкогинеколога и врача-психотерапевта (психиатра) в формировании мотивации и повышении приверженности и в целом эффективности данного вида метаболической реабилитации больных РЭ с метаболическим синдромом.

Как ранее было отмечено, рациональная фармакотерапия помогает более интенсивно снижать массу тела, предотвращает развитие рецидивов, улучшает метаболические показатели и закрепляет приверженность больных лечению. В данном аспекте необходимо отметить исследования L.A. Cantrell et al. (2010), где показано, что известный антидиабетический препарат метформин ингибирует пролиферацию в клеточных линиях РЭ ECC-1 и Ishikawa за счет активации аденозинмонофосфатазы и ингибирования mTOR сигнального пути.

Недавно были представлены новые аспекты метформина, который, кроме своего мягкого гипогликемического действия, снижает выраженность гиперинсулинемии, облегчает высвобождение инсулина из бета-клеток поджелудочной железы, увеличивает экспрессию инсулиновых рецепторов на адипоцитах, уменьшает пролиферацию эндотелиоцитов, гладкой мускулатуры и фибробластов в условиях гипоксии [18]. На клиническом материале в исследованиях Л.М. Берштейн с соавт. (2004) показано, что больные РЭ с высоко- и умереннодифференцированными опухолями имели статистически более высокий уровень инсулина и С-пептида в сыворотке крови по сравнению больными с низкодифференцированными и неэндометриоидными опухолями. Кроме того, уровень инсулинемии позитивно коррелировал со стадией заболевания только в группе высоко- и умереннодифференцированных опухолей. У части больных РЭ гиперинсулинемия и инсулинорезистентность ассоциировалась с агрессивным течением заболевания, но это не являлось результатом повреждения ДНК, что, по-видимому, позволяет предположить эффективность антидиабетических препаратов, глитазонов и статинов в лечении этой категории больных [8].

В настоящее время одобрены два лекарственных препарата для длительного лечения ожирения: сибутрамин и орлистат. Сибутрамин относится к ингибиторам обратного захвата норадреналина и серотонина. Нормализует уровень углеводов и липидов в крови в соответствии со степенью снижения веса. Орлистат – ингибитор панкреатической липазы, снижает всасывание поступающих с пищей жиров на 30 % и приводит к снижению уровня глюкозы и артериального давления в соответствии со степенью снижения веса, при этом уровень липидов снижается сильнее, вероятнее всего из-за уменьшения всасывания жиров. Что касается методов хирургического лечения ожирения, то в настоящее время это один из самых распространенных и эффективных методов лечения. Выделяют два основных метода: уменьшение объема желудка (наиболее распространенная из них – бандажирование желудка), и те, которые в дополнение к этому снижают всасывание питательных веществ в кишечнике (гастрошунтирование). Наряду с вышеперечисленными методами достаточно эффективными показали себя такие методы, как вертикальная гастропластика или билеопанкреатическое шунтирование (с выключением двенадцатиперстной кишки или без него) [15].

Таким образом, гиперпластические процессы и рак эндометрия на фоне метаболического синдрома являются важной медицинской и социальной проблемой. Метаболическая коррекция гормонально-метаболических нарушений у больных ГПЭ с высоким риском развития РЭ будет способствовать снижению риска злокачественной трансформации, что определяет необходимость дальнейшей разработки как методов прогнозирования течения ГПЭ на фоне метаболического синдрома, так и вариантов метаболической реабилитации таких больных. Метаболическая реабилитация больных РЭ, это, прежде всего, изменение стиля жизни в сочетании с рациональной фармакотерапией, которая позволит улучшить качество жизни этой категории больных, а также повысить показатели выживаемости вследствие снижения выраженности сопутствующей сердечно-сосудистой патологии и ее осложнений, минимизации проявлений поздних сосудистых осложнений, сахарного диабета и снижения риска развития полинеоплазий.

Литература

1. Александровский Я.А. Молекулярные механизмы взаимовлияния патологических процессов при совместном протекании сахарного диабета и рака. Научные и клинические аспекты // Биохимия. – 2002. – Т. 67, № 12. – С. 1611–31.
2. Анцифиров М. Б. Ожирение. Метаболический синдром. Сахарный диабет 2 типа / Под ред. академика РАМН И.И. Дедова. – М., 2000. – С. 53–61.
3. Артымук Н. В., Гуляева Л.Ф., Иленко Е.В. и др. Молекулярно-генетические аспекты рака эндометрия у женщин с нейроэндокринными нарушениями // Сибирский онкологический журнал. – 2007. – Приложение №1. – С. 5–8.
4. Баринев В.В. Мировые стандарты и результаты лечения рака эндометрия // Матер. V ежегодной Российской онкол. конференции. – М., 2002. – С. 82–3.
5. Берштейн Л.М., Чернобровкина А.Е., Гамаюнова В.Б. и др. Активность ароматазы, тканевое содержание эстрогенов и особенности течения рака тела матки // Вопросы онкологии. – 2003. – Т. 49, № 1. – С. 55–9.
6. Берштейн Л.М. Возраст, факторы внешней среды и гормональный канцерогенез // Вопросы онкологии. – 2001. – Т. 47, № 2. – С. 148–53.
7. Берштейн Л.М. Гормональный канцерогенез. – СПб.: Наука, 2000. – 199 с.
8. Берштейн Л.М. Онкоэндокринология: традиции, современность и перспективы. – СПб: Наука, 2004. – 340 с.
9. Берштейн Л.М. Современная эндокринология гормонозависимых опухолей // Вопр. онкол. – 2002. – Т. 48, №4. – С. 496–503.
10. Берштейн, Л.М. Эпидемиология, патогенез и пути профилактики рака эндометрия: стабильность или эволюция? // Практическая онкология. – 2004. – Т. 5, № 1. – С. 1–8.
11. Бутрова С.А. Метаболический синдром: патогенез, клиника, диагностика, подходы к лечению // РМЖ. – 2001. – Т. 9, № 2. – С. 56–62.
12. Бутрова С.А. Лечение ожирения: рекомендации для врачей. – М.: Медицина, 2002. – 21 с.
13. Вайнтрауб Б.Д. Молекулярная эндокринология. Фундаментальные исследования и их отражение в клинике. – М.: Медицина, 2003. – С. 191–233.
14. Васильев Д.А., Семенова Н.В., Берштейн Л.М. Сахарный диабет, нарушение толерантности к глюкозе и злокачественные образования: степень риска и меры воздействия // Росс. онкол. журн. – 2007. – № 3. – С. 25–8.
15. Глазкова О.Л., Топольская И.В., Подзолкова Н.М. Динамика метаболического синдрома у больных с железисто-кистозной гиперплазией эндометрия на фоне гормональной терапии. – Актуальные вопросы акушерства и гинекологии. Сб. науч. матер. Под ред. В.И.Кулакова, В.Н.Серова. – 2002. – 1(1). – С. 146–7.
16. Давыдов М.И., Кузнецов В.В., Нечушкина В.М. Лекции по онкогинекологии. – М.: «Медпресс-информ», 2009. – 427 с.
17. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Романцова Т.И. Патогенетические аспекты ожирения // Ожирение и метаболизм. – 2004. – 1. – С. 3–9.
18. Задонченко В.С., Адашева Т.В., Демичева О.Ю., Порывкина О.Н. Метаболический синдром: терапевтические возможности и перспективы // Consillium Medicum. – 2005. – Т. 7, № 9. – С. 725–33.
19. Квачевская, Ю.О. Особенности рака эндометрия при синдроме инсулинорезистентности. Дисс. ... канд. мед. наук. – СПб, 2000. – 162 с.
20. Киселев В.И., Мужейник Е.Л. Роль метаболитов эстрогенов в канцерогенезе репродуктивных органов // Акушерство и гинекология. – 2006. – № 3. – С. 1–4.
21. Кобалава Ж.Д., Толкачева В.В. Метаболический синдром: принципы лечения // Рус. мед. журн. – 2005. – Т. 13, № 7. – С. 451–8.
22. Коломиец Л.А., Чернышова А.Л., Крицкая Н.Г., Бочкарева Н.В. Клинико-морфо-биохимические аспекты гиперпластических процессов и рака эндометрия. – Томск: НТЛ, 2003. – 114 с.
23. Коломиец Л.А., Бочкарева Н.В., Чернышова А.Л. и др. Рак эндометрия и метаболический синдром. Томск: Изд-во «Иван Федоров», 2010. – 226 с.
24. Максимов С.Я., Гусейнов К.Д. Факторы риска возникновения злокачественных новообразований органов репродуктивной системы женщин // Вопросы онкологии. – 2003. – Т. 49, № 4. – С. 496–501.
25. Манухин И.Б., Тумилович Л.Г., Геворкян М.А. Клинические лекции по гинекологической эндокринологии. – М., 2001. – 247 с.
26. Мерабишвили В.М., Сафронникова Н.Р. Злокачественные новообразования женских половых органов (заболеваемость) // Матер. IX Всероссийской конференции онкологов «Гормонозависимые опухоли». – СПб, 2002. – 518 с.
27. Никанорова Л.В., Попова А.А., Ковалев Б.Н., Старинский В.В. Рак тела матки (основные статистические показатели) // Матер. IX Всероссийской конференции онкологов «Гормонозависимые опухоли». – СПб, 2002. – 518 с.
28. Никитина В.П. Состояние эндокринной системы у больных раком тела матки. Автореферат дисс. ... д-ра мед. наук. – Ростов-на-Дону, 2005. – 26с.
29. Панков Ю.А. Революционные перемены в эндокринологии // Проблемы эндокринологии. – 2005. – Т. 51, № 6. – С. 3–8.
30. Петунина Н.А. Современные подходы к лечению ожирения // Гинекология. – 2002. – Т. 4, № 1. – С. 32–5.
31. Соколова Е.И., Миронова Е.К., Зыкова А.А. Гормональная дезинтеграция при метаболическом синдроме // Клиническая медицина. – 2008. – № 2. – С. 52–7.

32. Топольская И.В. Дифференцированная гормональная терапия гиперпластических процессов эндометрия у больных с метаболическим синдромом. – Дисс. ... канд. мед. наук. М., 2002. – 142с.
33. Цаллагова Е.В., Прилепская В.Н. Роль снижения избыточной массы тела в восстановлении функции репродуктивной системы женщины // Гинекология. – 2005. – Т. 1, № 7. – С. 51–3.
34. Чернышова А.Л., Коломиец Л.А., Бочкарева Н.В. Рак эндометрия у больных с метаболическим синдромом. – Издано LAP LAMBERT Academic Publishing. 2011-08-26. – ISBN-13 : 978-3-8454-3012-6. – 265с.
35. Чиссов В.И., Старинский В.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2007 г. – М., 2008. – 176 с.
36. Alcazar J.L., Galan M.J., Jurado M., Lopez-Garcia G. Intratumoral blood flow analysis in endometrial carcinoma: correlation with tumor characteristics and rise for recurrence // Gynecol. Oncol. – 2002. – 84. – P. 245–51.
37. Burroughs K.D., Dunn S.E., Barrett L.C., Taylor J.A. Insulin-like growth factor I: a key regulator of human cancer risk // J. Nat. Cancer Inst – 1999. – 91. – P. 579–81.
38. Cannata D., Fierz Y., Vijayakumar A., LeRoith D. Type 2 diabetes and cancer: what is the connection? // Mt Sinai J Med. – 2010. – 77(2). – P. 197–213.
39. Horn L.C., Schmidt D. Recommendations for the oncologic pathology report and morphologic factors associated with prognosis in endometrial carcinoma // Zentral. Gynecol. – 2002. – 124. – P. 36–44.
40. Kalli K.R., Chen B.K., Bale L.K. et al. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) expression and insulin-like growth factor binding protein-4 protease activity in normal and malignant ovarian surface epithelial cells. // Int.J. Cancer. -2004/-Vol.110(5).-P.633-640.
41. Kuramoto H., Jobo T., Ohkawara S. et al. Endometrial carcinoma: one disease? // Endometr. Cancer. – 2000. – 10. – P. 69–70.
42. Larsson S.C., Wolk A. Diabetes mellitus and incidence of kidney cancer: a meta-analysis of cohort studies // Diabetologia. – 2011. – 54(5). – P. 1013–8.
43. Larsson S.C., Mantzoros C.S., Wolk A. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis // International Journal of Cancer. – 2007. – 121(4). – P. 856–862.
44. Li D., Tang H., Hassan M.M. et al. Diabetes and risk of pancreatic cancer: a pooled analysis of three large case-control studies // Cancer Causes and Control. – 2011. – 22(2). – P. 189–97.
45. Session R., Kalli K.R., Tummon I.S. et al. Treatment of atypical endometrial hyperplasia with aninsulin-sensitizing agent // Gynecol Endocrinol. – 2003. – 17. – P. 405–7.
46. Wang C., Wang X., Gong G. et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies // International Journal of Cancer. – 2011. – 7(6). – P. 1639–48.
47. Yamada K., Araki M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis // J. of cell science. – 2001. – 114. – P. 2375–82

Список сокращений

ГПЭ
ДАД
МС
ИНСД
РЭ
МС
СПКЯ
ТГ
ЛПВП
ИР
ПССГ
ИФР
ЛГ
ЕН
ЕС
IDF

гиперпластическими процессами
диастолическое артериальное давление
метаболический синдром
инсулин независимый сахарный диабет
раком эндометрия
Метаболический синдром
синдром поликистозных яичников
триглицеридов
липопротеидов высокой плотности
инсулинорезистентность
половые стероиды связывающие глобулин
инсулиноподобных факторов роста
лютеинизирующего гормона
endometrial hyperplasia
endometrial cancer
International Diabetes Federation

УДК 577.352.2:576.3(048.8)

М.А. Барышникова¹, М.Т. Зангиева¹, А.Ю. Барышников^{1, 2}**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИПИДНЫХ НАНОКАПСУЛ С КЛЕТКОЙ**¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва²ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва**Контактная информация**

Барышникова Мария Анатольевна, канд. фарм. наук, старший научный сотрудник лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДнТО

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(499)324-10-65

e-mail: ma_ba@mail.ru

Статья поступила 18.01.2013, принята к печати 01.02.2013.

Резюме

Обзор литературы посвящен взаимодействию липидных нанокapsул, к которым относятся липосомы и иммунолипосомы, с клеткой. Обсуждаются различные механизмы проникновения липосом и иммунолипосом в клетку, их судьба в клетке.

Ключевые слова: липосомы, иммунолипосомы, клетка, интернализация, эндосомы.

M.A. Baryshnikova, M.T. Zangieva, A.Yu. Baryshnikov

INTERACTION OF LIPID NANOCAPSULES AND CELL

FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow

Abstract

This review is focused on interaction of lipid nanocapsules (liposomes and immunoliposomes) and cell. Different mechanisms of internalization of liposomes and immunoliposomes into cell are discussed.

Key words: liposomes, immunoliposomes, cell, internalization, endosomes.

Введение

Липидные нанокapsулы обсуждаются во многих публикациях как удобный инструмент для направленной доставки противоопухолевых препаратов [1; 2; 4; 7; 8; 11; 12; 15; 31; 33; 42; 45]. Липосомы – сферические структуры, состоящие из одного или многих концентрических липидных бислоев, структура которых похожа на биологическую мембрану. В гидрофильную фазу липидного бислоя липосом можно включать водорастворимые препараты, а в гидрофобную – водонерастворимые субстанции. Благодаря этому свойству липосом созданы из водонерастворимых субстанций препараты для фотодинамической терапии [5; 6]. Липосомы увеличивают доставку в опухоль большего количества препаратов. Так, липосомы диаметром 70 нм способны содержать 2 000 молекул лекарства, а конъюгаты полимера и лекарства – только 9 молекул [17; 38]. Липосомы биосовместимы с организмом, не аллергенны, не антигенны и не токсичны [60]. Для активной направленной доставки липосомы конъюгируют с различными лигандами, включая антитела или фрагменты антител, витамины, гликопротеины, пептиды и олигонуклеотиды [41]. Иммунолипосомы получают, конъюгируя с липидными нанокapsулами антитела или фрагменты антител, являющиеся целевыми лигандами. Мишенями иммунолипосом являются различные поверхностные мембранные антигены опухолевых клеток или вновь образующихся сосудов опухоли, отсутствующие на нормальных тканях [3].

Пути интернализации липидных нанокapsул

Понимание процессов интернализации и переработки липидных нанокapsул в клетке важно для обеспечения эффективной доставки препаратов в клетку [66]. Большинство знаний о процессах ин-

тернализации было получено при изучении вирусных частиц [50]. Липосомы и иммунолипосомы интернализируются двумя путями – слиянием с цитоплазматической мембраной и эндоцитозом. Большинство липидных нанокapsул интернализируются клетками через пути эндоцитоза [40]. Эндоцитоз подразделяют на клатрин-зависимый и кавеол-зависимый [19; 55]. Кроме того, описаны клатрин/кавеол-независимый эндоцитоз и холестерол-зависимый эндоцитоз [21; 26; 43; 44; 48]. Также липосомы могут интернализоваться путем макропиноцитоза.

Процесс внутриклеточной доставки лекарств зависит от свойств наноносителя и от пути эндоцитоза, который определяется молекулярной инициацией, размером и составом эндоцитируемых везикул. [46; 52; 55; 61; 68].

Клатрин-зависимый эндоцитоз является главным механизмом интернализации иммунолипосом [39]. При этом иммунолипосома связывается с рецептором цитоплазматической мембраны, что вызывает сборку AP-2 комплекса на внутренней стороне цитоплазматической мембраны. AP-2 комплекс служит центром для полимеризации клатрина. Когда последний закрепляется на внутренней стороне цитоплазматической мембраны, эта локальная зона начинает инвагинировать, и образуется ямка. Затем липосома целиком обволакивается мембраной, и с помощью белка динамина везикула отпочковывается от цитоплазматической мембраны в цитозоль. Покрытые клатрином везикулы затем теряют его и после этого называются эндосомами [18; 54; 66]. Мембранная протонная помпа в эндосомах вызывает приток протонов, что приводит к длительному снижению pH при созревании эндосомы. В ранних эндосомах pH составляет 6,2–6,3, а в поздних – 5,0–5,5.

Поздние эндосомы сливаются с лизосомами, в которых $\text{pH} = 4,8\text{--}5,4$ [36]. Содержимое ранних эндосом может рециклировать через каналы в мембране эндосомы и освобождаться в цитозоль. Лизосомы содержат переваривающие ферменты и разрушают липосомы [22].

Макропиноцитоз – клатрин-независимый, но холестерол-зависимый путь эндоцитоза крупных молекул в опухолевых клетках, происходящий с активацией мембраны или цитоскелета. Этим способом интернализируются частицы размером больше 500 нм [27]. Макропиноцитоз начинается с появления крупных волн на поверхности цитоплазматической мембраны, которые затем втягиваются внутрь и закрываются. До недавнего времени считалось, что макропиноцитоз является неселективным процессом интернализации. Однако сейчас обнаружено, что макропиноцитоз участвует в сборе антигенов антиген презентирующими клетками [27]. В результате макропиноцитоза образуются эндосомы, содержимое которых впоследствии разрушается лизосомами [66].

Кавеолин-зависимый эндоцитоз имеет сходство с клатрин-зависимым эндоцитозом, но их главное различие – в дальнейшей судьбе липидных нанокapsул внутри клетки. В кавеолин-зависимый эндоцитоз вовлечены кавеолин-1⁺ структуры, которые состоят из больших внутриклеточных структур с нейтральной pH , малых везикул и трубочек. Кавеолиновые белки распознают липидные домены (липидные рафты), которые содержат локально высокие концентрации холестерина, насыщенных липидов и сигнальных белков, таких как рецепторы, интегрины и киназы [18; 66]. Кавеолиновые белки собираются во внутреннем слое плазматической мембраны, образуя шпилькообразные структуры. Предполагается, что эти структуры усиливают изгиб мембраны, образуя небольшие инвагинации. Как и при клатрин-зависимом эндоцитозе, с помощью динамина происходит отсечение инвагинации с образованием эндосомы, которая называется кавеосомой. Кавеосомы не доставляют свой груз в лизосомы и таким образом избегают лизосомальной деградации. Они имеют нейтральный pH и являются промежуточным переносчиком [18]. В настоящее время неизвестно, что далее происходит с кавеосомой и ее содержимым внутри клетки. Однако перед исследователями стоит задача направить липидные нанокapsулы по пути кавеолин-зависимого эндоцитоза, так как это возможно обеспечивает сохранную доставку соединений белковой природы в клетку без их деградации в лизосомах.

Хотя липидные нанокapsулы в большинстве случаев входят в клетку с помощью разных путей эндоцитоза, слияние с цитоплазматической мембраной возможно и даже желательно для прямой доставки содержимого в цитозоль для избегания лизосомального разрушения. Пока не ясно, является ли пенетрация липосомами цитоплазматической мембраны пассивным или активным процессом. Одни исследователи считают процесс пассивным, хотя другие – активным [35; 48; 63].

Вероятно, механизм слияния липосомы с клеткой зависит от размера и состава липосомы, а также типа клеток-мишеней.

Так, липосомы размером 100 нм хуже проникают в клетку по сравнению с липосомами размером 50 нм [48]. Для содействия прямому слиянию исследуется взаимодействие липидных рафтов на клеточной мембране с различными составами липосом [30].

Подходы к улучшению проникновения липидных нанокapsул в клетку

Проникновение иммунолипосом в клетку представляет собой процесс взаимодействия между лигандом и рецептором. Показано, что связывание несущих препарат иммунолипосом с эпитопом, способным к интернализации, приводит к эффективному попаданию лекарства в клетку и вызывает хороший терапевтический эффект. Преимущество имеют те антитела, которые индуцируют пиноцитоз комплекса антиген-иммунолипосомы, т.к. не все антигены способны попадать внутрь клетки после контакта с антителом. Хорошо интернализируются моноклональные антитела против лейкоцитарных антигенов CD5 и CD19, не интернализируются антитела против В-клеточных антигенов CD20 и HLA-DR [9].

С целью улучшения проникновения липосом в цитоплазму используют пенетрирующие клетку пептиды, которые могут рассекать клеточную мембрану и способны индуцировать слияние мембраны с липосомой при низком pH . Это пептиды главным образом олигокатионной природы, происходящие из белков вирусов, насекомых или млекопитающих с мембрано-транслоцирующими свойствами, т.е. относящиеся к семейству ТАТ [23; 28; 47; 61; 67]. Доставка препаратов с помощью модифицированных пенетрирующими пептидами липосом происходит с участием разных механизмов. Для ТАТ-модифицированных липосом показано, что ТАТ связывается с отрицательно заряженным гликозаминогликаном на клеточной поверхности через ионное взаимодействие. Также ТАТ может взаимодействовать с липидными рафтами на клеточной поверхности независимым от рецепторов образом, стимулируя интернализацию путем макропиноцитоза, вызывая снижение pH и дестабилизацию липидного бислоя макропиносомных везикул [20; 64; 65]. Модифицированные пенетрирующими пептидами липосомы могут также интернализироваться путем клатрин- или кавеолин-зависимого эндоцитоза [53]. Механизм интернализации, обусловленный пенетрирующими пептидами, определяется многими факторами, включающими концентрацию пептида, тип клеток, мембранные компоненты [39].

Оригинальным направлением является включение в липосомы порообразующего белка листериолизина О, который улучшает доставку макромолекул из липосом в цитоплазму клетки [34]. Листериолизин О является белком с молекулярной массой 58 кДа. Он использует холестерил для образования пор в эндосомальной мембране. С помощью этого белка *L. monocytogenes* выходит из эндосом в цитоплазму инфицированных клеток. М. Kulberg et al. продемонстрировали, что включение листериолизина О в термочувствительные иммунолипосомы против Her-2–рецептора повысило в 22 раза проникновение иммунолипосом в цитоплазму антиген-положительных клеток. Кроме того, способность листериолизина О образовывать поры в эндосомах приводит к выходу препарата в цитоплазму клетки. Использование векторной системы, основанной на моноклональных антителах против Her-2–рецептора и включенного в липосому листериолизина О, позволило снизить эффективную терапевтическую дозу противоопухолевого препарата, при которой погибали опухолевые клетки рака молочной железы *in vitro*, в тысячу раз [34].

До конца не ясен вопрос о количестве включенного в липосомы препарата, попадающего в лизосомы. По данным A. Paillard et al. после 2 ч

экспозиции в лизосомах обнаруживали только 10 % липосомального препарата, поступившего в клетку [48]. В этой работе липидные нанокapsулы состояли из триглицеридов, лецитина, неионного сурфактанта и полиэтиленгликоля гидроксистеарата (HS-PEG). Эти липосомы после 2 мин экспозиции накапливались в клетке через активный и насыщающий механизмы с вовлечением эндогенного холестерина, главным образом – через клатрин/кавеолин-независимый пути. Однако по другим данным [29; 37; 55; 58] в лизосомах находили около 80 % наночастиц. Вероятно, результат зависит от композиции липидов и от размера липосом.

Липосомы значительно улучшают транспорт препарата из апикальных в базолатеральные компартменты поляризованных эпителиальных клеток [48; 56]. Они препятствуют эффлюксу препарата из апикальной части клеток. Липосомальная лекарственная форма препарата может не только помочь в продвижении препарата в цитоплазме клеток, но также снизить накопление препарата в кислых субклеточных компартментах [48].

Судьба липидных нанокapsул внутри клетки

Для белковых препаратов, а также содержащих ДНК и РНК, важно, чтобы они быстро освободились из эндосом и не попали в лизосомы, так как существует риск инактивации загруженного в нанокapsулу терапевтического препарата кислыми гидролазами из эндо-лизосомальных компартментов [29; 49; 66]. Например, siRNA эффективны только при доставке в цитозоль клетки [13].

На судьбу липидных нанокapsул в клетке также влияет пегилирование, которое является серьезным барьером для эндосомального освобождения препаратов [22; 25; 62]. Хотя пегилирование увеличивает время циркуляции липосом в крови и способствует накоплению их в опухоли, оно снижает захват липосом клетками, а поступивший в клетку препарат не может выйти из эндосом и далее разрушается в лизосомах. Эти конфликтные свойства ПЭГ известны под названием «ПЭГ-дилемма» [51].

Освобождение лекарственного препарата из эндосом представляет собой большую проблему [22; 24; 34; 48; 62].

Литература

1. Барышников А.Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов // Вестник РАМН. – 2012. – № 3. – С. 23–32.
2. Барышников А.Ю., Оборотова Н.А. Иммунолипосомы – новое средство доставки лекарственных препаратов // Современная онкология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 4–5.
3. Барышникова М.А., Барышников А.Ю. Иммунолипосомы и мишени их действия // Российский химический журнал. – 2012. – № 3–4. – С. 53–9.
4. Костин К.В., Игнатъева Е.В., Тазина Е.В. и др. Технология получения и анализ липосомальной лекарственной формы лизомустина. Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45, № 7. – С. 44–7.
5. Меерович И.Г., Оборотова Н.А. Применение липосом в фотохимиотерапии: 1. Липосомы в ФДТ // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 3–8.
6. Меерович И.Г., Оборотова Н.А. Применение липосом в фотохимиотерапии. 2. Липосомальные формы для создания фотоактивируемых липосомальных препаратов и фотобиологических исследований // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 6–12.
7. Оборотова Н.А. Липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – Т. 35, № 4. – С. 32–38.
8. Оборотова Н.А., Санарова Е.В. Роль новых фармацевтических технологий в повышении избирательности действия противоопухолевых препаратов // Российский химический журнал. – 2012. – № 3–4. С. 33–40.
9. Соколова Д.В., Степанова Е.В., Трещалина Е.М. и др. Основные биологические характеристики ксенографтов лимфомы человека ЛБР-2 как мишени для таргетной терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 49–52.
10. Тазина Е.В., Оборотова Н.А. Селективная доставка препаратов в опухоль с помощью термочувстви-

Пенетрация эндосомального барьера и доставка макромолекул в цитоплазму клеток остается важной задачей в разработке системы липосомальной доставки препаратов. Учитывая важность высвобождения макромолекул в цитоплазму клетки, разрабатываются различные методы освобождения препарата из эндосом. К этим методам относится конъюгация липосом с вирусными компонентами, вследствие чего увеличивается вероятность слияния липосом с эндосомальной мембраной через окисление эндосом [59]. Избеганию попадания наночастиц в лизосомы способствует их комбинация с pH-чувствительными пептидами, сливающимися липоплексом, «proton sponge» полиплексом или динамической поликонъюгацией, что также вызывает слияние липосомальной и эндосомальной мембран [14; 57; 59; 69]. Другим подходом является включение в липосомы разрушающих мембрану полимеров и фотосенсибилизаторов, вызывающих разрушение эндосом и повышающих цитоплазматическую доставку лекарственного препарата.

Показано, что быстрое освобождение доксорубина из интернализированных липосом коррелирует с накоплением доксорубина в клеточном ядре и большей цитотоксичностью [32]. Сейчас активно исследуются вопросы усиления внутриклеточной доставки и триггерного освобождения доксорубина из интернализированных липосом. Это достигается путем температурного воздействия в термозависимых липосомах [10; 16].

Заключение

Липидные нанокapsулы являются удобной системой для направленной доставки лекарственных препаратов в опухоль. Они дают возможность использовать меньшие концентрации противоопухолевых химиопрепаратов, снижают токсичность, и доставляют их непосредственно в опухоль. Однако для олигонуклеотидов и белков, которые активно изучаются для применения в онкологии, есть риск разрушения внутри лизосом. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования, направленные на совершенствование лекарственной формы для улучшения высвобождения препаратов из эндосом в цитоплазму опухолевой клетки.

- тельных липосом и локальной гипертермии // Российский биотерапевтический журнал. – 2008. – Т. 7, № 3. – С. 4–12.
11. Хугаева О.В., Яворская Н.П., Голубева И.С. и др. Сравнительное изучение противоопухолевой активности различных лекарственных форм метаксантрона // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 3. – С. 51–4.
 12. Швец В.И., Краснополяский Ю.М. Липосомы в фармации. Продукты нанобиотехнологии // Провизор. – 2008. – № 3. – С. 18–24.
 13. Aigner A. Delivery systems for the direct application of siRNA to induce RNA interference (RNAi) in vivo // J Biomed Biotechnol. – 2006. – 2996. – P. 1–15.
 14. Akins A., Thomas M., Klibanov A.M., Longer R. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis // J Gene Med. – 2005. – 7. – P. 657–63.
 15. Al-Jamal W.T., Al-Jamal K.T., Bomans P.H. et al. Functionalized-quantum-dot-liposome hybrids as multimodal nanoparticles for cancer // Small. – 2008. – 4. – P. 1406–15.
 16. Bandekar A., Karve S., Chang M.-Y. et al. Antitumor efficacy following the intracellular and interstitial release of liposomal doxorubicin // Biomaterials. – 2012. – 33. – P. 4345–52.
 17. Barlett D.W., Davis M.E. Pharmacochemical and biological characterisation of targeted, nucleic acid-containing nanoparticles // Bioconjugate Chem. – 2007. – 18. – P. 456–68.
 18. Benmerach A., Lamaze C. Clathrin-coated pits: Vive la difference? // Traffic. – 2007. – 8. – P. 970–982.
 19. Conner S.D., Schmid S.L. Regulated portals of entry into the cell // Nature. – 2003. – 422. – P. 37–44.
 20. Console S., Marty C., Garcia-Echeverria C. et al. Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) “protein transduction domains” promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans // J. Biol. Chem. – 2003. – 278. – P. 35109–14.
 21. Doherty G.J., McMahon H.T. Mechanisms of endocytosis // Annual Review of Biochemistry. – 2009. – 78. – P. 857–902.
 22. Dominska M., Dikhoorn D.M. Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosomal escape // J. Cell Sci. – 2010. – 123. – P. 1183–9.
 23. Futaki S. Arginine-rich peptides: potential for intracellular delivery of macromolecules and the mystery of the translocating mechanisms // International J of Pharmaceutics. – 2002. – 245. – P. 1–7.
 24. Gao J., Liu W., Xia Y. et al. The promotion of siRNA delivery to breast cancer overexpressing epidermal growth factor receptor through anti-EGFR antibody conjugation by immunoliposomes // Biomaterials. – 2011. – 32. – P. 3459–70.
 25. Gao J., Yu Y., Zhang Y. et al. EGFR-specific PEGylated immunoliposomes for active siRNA delivery in hepatocellular carcinoma // Biomaterials. – 2012. – 33. – P. 270–82.
 26. Glebov O.O., Brigh N.A., Nicholas B.J. Flotrin-1 defines a clathrin-independent endocytosis pathway in mammalian cells // Nat. Cell Biol. – 2006. – 8. – P. 46–54.
 27. Gong Q., Huntsman C., Ma D. Clathrin-independent internalization and recycling // J. Cell Mol. Med. – 2008. – 12. – P. 126–44.
 28. Gupta B., Torchilin V.P. Transactivating transcriptional activator-mediated drug delivery // Expert Opinion on Drug Delivery. – 2006. – 3. – P. 177–190.
 29. Harush-Frenkel O., Rozentur E., Benita S., Altschuler Y. Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells // Biomacromolecules. – 2008. – 9. – P. 435–43.
 30. Ikonen E. Roles of lipid rafts in membrane transport // Curr Opin Cell Biol. – 2001. – 13. – P. 470–7.
 31. Kang D.I., Kang H.K., Gwak H.S. et al. Liposome composition is impotent for retention of liposomal rhodamine in P-glycoprotein-overexpressing cancer cells // Drug Deliv. – 2009. – 16. – P. 261–7.
 32. Kirchmeier M.J., Ishida T., Chevrette J., Allen T.M. Correlations between the rate of intracellular release of endocytosed liposomal doxorubicin and cytotoxicity as determined by a new assay // J. Liposome Res. – 2001. – 11. – P. 15–29.
 33. Kizek R., Adam V., Hrabeta J. et al. Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: Recent advances // Pharmacology & Therapeutics. – 2012. – 133. – P. 26–39.
 34. Kullberg M., Owens J.L., Mann K. Listeriolysin O enhances cytoplasmic delivery by Her-2 targeting liposomes // J. of Drug Targeting. – 2010. – 18. – P. 313–20.
 35. Kunisawa J., Masuda T., Katayama K. et al. Fusogenic liposome delivers encapsulated nanoparticles for cytosolic controlled gene release // J. Control Release. – 2005. – 105. – P. 344–53.
 36. Lakadamyali M., Rust M.J., Zhuang K. Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes // Cell. – 2006. – 124. – P. 997–1009.
 37. Lai S.K., Hida K., Man S.T. et al. Privileged delivery of polymer nanoparticles to the perinuclear region of live cells via a non-clathrin, non-degradative pathway // Biomaterials. – 2007. – 28. – P. 2876–84.
 38. Lee H., Lee K., Park T.G. Hialuronic acid-paclitaxel conjugate micelles: synthesis, characterization, and anti-tumor activity // Bioconjugate Chem. – 2008. – 19. – P. 1319–25.
 39. Li Y., Wang J., Guillaume M. et al. Delivery of nanomedicines to extracellular and intracellular compartments of a solid tumor // Adv. Drug Delivery Rev. – 2012. – 64. – P. 29–39.
 40. Mandal M., Mathew E., Provoda C., Dall-Lee K. Delivery of macromolecules into cytosol using liposomes containing hemolysin // Methods Enzymol. – 2003. – 378. – P. 319–39.
 41. Manjappa A.S., Chaudhari K.R., Venkataraju M.P. et al. Antibody derivatization and conjugation strategies: Application in preparation of stealth immunoliposome to target chemotherapeutic tumor // Journal of Controlled Release. – 2011. – 150. – P. 2–22.
 42. Matsui M., Shimizu Y., Kadera Y. et al. Targeted delivery of oligomannose-coated liposome to the omental micrometastasis by peritoneal macrophages from patients with gastric cancer // Cancer Sci. – 2010. – 101. – P. 1670–7.
 43. Mercer J., Helenius A. Virus entry by macropinocytosis // Nat Cell Biol. – 2009. – 11. – P. 510–20.

44. *Nabi I.R., Le P.U.* Caveolae/raft-dependent endocytosis // *J. Cell Biol.* – 2003. – 161. – P. 873–77.
45. *Narayanan N.K., Nargy D., Randolph C., Naryanan B.A.* Lyposome encapsulation of curcumin and resveratrol in combination reduces prostate cancer incidence in PTEN knockout mice // *Int J Cancer.* – 2009. – 125. – P. 1–8.
46. *Nichols B.* Caveosomes and endocytosis of lipid rafts // *J. Cell Sci.* – 2003. – 116. – P. 4707–14.
47. *Padari K., Saalik P., Hansen M. et al.* Cell transduction pathways of transports // *Bioconjugate Chemistry.* – 2005. – 18. – P. 1399–410.
48. *Paillard A., Hindre F., Vignes-Colombeix C. et al.* The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability // *Biomaterials.* – 2010. – 31. – P. 7542–54.
49. *Panyam J., Zhou W.Z., Sahou S. et al.* Rapid endo-lysosomal escape of poly(a-lactide-co-glicolide) nanoparticles: implications for drug and gene deliveriy // *Faseb J.* – 2008. – 16. – P. 1217–26.
50. *Pelkman J., Helenius A.* Insider information: what viruses tell us about endocytosis // *Curr Opin Cell Biol.* – 2003. – 15. – P. 414–22.
51. *Perche F., Torchilin V.P.* Recent Trends in Multifunctional Liposomal Nanocarriers for Enhanced Tumor Targeting // *Journal of Drug Delivery.* – Volume 2013. – Article ID 705265. – 32 pages. – <http://dx.doi.org/10.1155/2013/705265>
52. *Prabha S., Zhou W.Z., Panyam J., Labhasenwar V.* Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles // *Int.J. Pharm.* – 2002. – 244. – P. 105–15.
53. *Raagel H., Saalic P., Hansn M. et al.* CPP-protein constructs induce a population of non acidic vesicles during trafficking through endolysosomal pathway // *J. Controlled Release.* – 2009. – 139. – P. 108–17.
54. *Rappoport J.Z.* Focusing on clathrin-mediated endocytosis // *Biochem J.* – 2008. – 412. – P. 415–23.
55. *Rejman J., Oberle V., Zuhorn I.S., Hoekstra D.* Size-dependent internalization of particles via the pathway of clatrin- and caveolin-mediated endocytosis // *Biochem.J.* – 2004. – 377. – P. 159–168.
56. *Roger E., Lagarce F., Garcion E., Benoit J.P.* Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis // *J Control Release.* – 2009. – 140. – P. 174–81.
57. *Rosema D.B., Lewis D.L., Wakefild D.H. et al.* Dynamic polyconjugates for targeted in vivo delivery of siRNA to hepatocytes // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2007. – 104. – P. 12982–7.
58. *Ruckert P., Bates S.R., Fisher A.B.* Role of clatrin- and actin-dependent endocytic pathway in lung phospholipid uptake // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2003. – 284. – P. 1982–2089.
59. *Sasaki K., Kogure K., Chaki S. et al.* An artificial virus-like nano carrier system: enhanced endosomal escape of nanoparticles via synergistic action of pH-sensitive fusogenic peptide derivatives // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2008. – 391. – P. 2717–27.
60. *Torchilin V.P.* Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2005. – 4. – P. 145–60.
61. *Torchilin V.P.* Recent approached to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting // *Annu Rev Biomed Eng.* – 2006. – 8. – P. 343–75.
62. *Tseng Y.C., Mozumdar S., Huang L.* Lipid-based systemic delivery of siRNA // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2009. – 61. – P. 721–31.
63. *Verma A., Uzun O., Hu Y. et al.* Surface-structure-regulated cell-membrane penetration nanoparticles // *Nat. Mater.* – 2008. – 7. – P. 588–9.
64. *Vives E., Richard J.P., Rispal C., Lebleu B.* TAT peptide internalization: seeking the mechanism of entry // *Curr. Protein @ Peptide Science.* – 2003. – 4. – P. 125–32.
65. *Wadia J.S., Stan R.V., Dowdy S.F.* Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis // *Nature Med.* – 2004. – 10. – P. 310–5.
66. *Whittenton J., Pitchumani R., Thevananther S., Mohanty K.* Evaluation of asymmetric immunoliposomal nanoparticles for cellular uptake // *Journal of Microencapsulation.* – 2013. – 30(1). – 55–63.
67. *Yuan J.P., Kramer A., Eckerdt F. et al.* Efficient internalization of the polo-box of polo-like kinase 1 fused to an antennapedia peptide results in inhibition of cancer cell proliferation // *Cancer Research.* – 2002. – 62. – P. 4186–90.
68. *Zauer W., Farrow N.A., Haines A.M.* In vitro uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density // *J. Control. Release.* – 2001. – 71. – P. 39–51.
69. *Zelphati O., Szoka Jr.F.C.* Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes // *Proc Natl.Acad Sci USA.* – 1996. – 93. – P. 1493–8.

Список сокращений

ПЭГ
TAT
siRNA

полиэтиленгликоль
трансаktиваторы транскрипции
small interfering RNA (малые интерферирующие РНК)

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ»

Работа может быть статьей экспериментального или клинического характера, теоретической или концептуальной, обзором по материалам литературы, рецензией, сообщением дискуссионного, исторического или хроникального характера, рефератом зарубежных работ.

Статьи экспериментального или клинического характера имеют разделы: Резюме; Введение; **Материалы и методы**; **Результаты и обсуждение**; **Выводы (Заключение)**; **Литература**.

Обзоры литературы, статьи теоретического и концептуального характера имеют разделы: **Резюме**; **Введение**; **Разделы по отдельным обсуждаемым вопросам**; **Выводы**; **Литература**.

Статья должна быть представлена в виде файла формата RTF на дискете или CD и распечатана в 2 экземплярах. На внешней стороне дискеты или коробке CD должны быть указаны фамилия первого автора, названия статьи и файлов.

В основном файле должен содержаться текст статьи, таблицы, подписи и надписи к рисункам, список литературы. Кроме того, на дискете или CD должны быть записаны рисунки (каждый в виде отдельного файла).

Штриховые и тоновые рисунки (фотографии, рентгенограммы и т.д.), то есть растровая графика, должны быть сохранены в виде файлов формата TIF или JPEG, графики и диаграммы (векторная графика) – в виде файлов формата EPS. Если автор не работает с современными программными пакетами для создания векторной графики, можно прислать график в виде файла Microsoft Excel 5.0/95 с обязательным приложением в виде таблицы, по которой данный график построен.

Обзорные статьи не должны превышать 17 страниц, оригинальные статьи – 12 страниц.

Весь текст должен быть набран шрифтом Times New Roman 12 через полуторный интервал. Текст должен быть выровнен по левому краю.

Все страницы должны быть пронумерованы. Номер страницы должен быть расположен внизу справа, начиная со второй. Каждый абзац должен начинаться с красной строки, которая устанавливается меню «Абзац».

Не следует использовать для красной строки клавишу Tab. Десятичные дроби следует писать через запятую. При наборе текста следует различать дефис и тире. Последнее вводится одновременным нажатием клавиш Ctrl+Alt+дефис с дополнительной клавиатуры при горящем указателе Num Lock.

Набирая заголовки, названия разделов, таблиц, подписи и надписи на рисунках, точку в конце ставить не нужно. Выравнивать по центру и устанавливать красную строку для всего перечисленного также не нужно.

В начале статьи следует указать *имя, отчество и фамилии авторов* полностью, **НАЗВАНИЕ СТАТЬИ**, место работы в именительном падеже (если авторы работают в разных учреждениях, уточнить это дополнительно), должность и контактную информацию для каждого автора (почтовый **адрес**, **e-mail**). Авторы несут ответственность за точность предоставляемой ими информации о себе и месте своей работы.

В начале статьи должно быть приведено **Резюме**. В нем должны быть кратко без рубрики указаны цель исследования, материалы и методы, полученные автором результаты и основные выводы. В конце резюме автор приводит **Ключевые слова** работы (не более 5). Рекомендуемый объем реферата – 500–1000 печатных знаков. Отступление от этой схемы допустимо только в отношении обзорных статей.

Далее необходимо на английском языке дать фамилии авторов и их инициалы, название статьи, название учреждений, резюме (**Abstract**) и ключевые слова (**Key words**).

Статья должна быть написана ясно, четко, лаконично, тщательно выверена авторами, не содержать повторов и исправлений. Сокращения допустимы только в отношении часто встречающихся в статье терминов. Сокращение вводится при первом вхождении в круглых скобках и в дальнейшем используется по всему тексту.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 616-006.448-02:577.175.722

*С.С. Шушанов, Т.А. Кравцова, А.А. Ставровская***IGF-1-ЗАВИСИМАЯ ЭКСПРЕССИЯ МРНК ГЕНА *MRP1* И *LRP* В ЛИНИЯХ КЛЕТОК МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА***ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва***Контактная информация***Шушанов Саин Сакенович, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики опухолевых клеток НИИ канцерогенеза***адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(499)324-17-69**e-mail:** sainHershy@yandex.ru

Статья поступила: 12.04.2012, принята к печати: 30.10.2012.

Резюме

В работе была исследована роль экзогенного IGF-1 в регуляции экспрессии мРНК генов *MDR1*, *MRP1*, *BCRP*, *LRP*, ответственных за возникновение МЛУ, в трех линиях клеток ММ человека: RPMI1640, RPMI8226 и IM9. Указанные линии клеток культивировали в среде без сыворотки в присутствии и отсутствии экзогенного IGF-1 в течение 72 ч, а затем с использованием метода ОТ-ПЦР исследовали экспрессию мРНК генов МЛУ. Было показано, что в линии клеток RPMI8226 экзогенный IGF-1, добавленный в физиологических концентрациях, негативно регулировал экспрессию мРНК генов *MRP1* и *LRP* и не влиял на экспрессию мРНК гена *BCRP*. Экспрессия мРНК *MDR1* в этой линии клеток не выявлялась изначально. В двух других линиях клеток ММ: RPMI1640 и IM9 экзогенный IGF-1 не влиял на экспрессию мРНК исследованных генов МЛУ.

Ключевые слова: множественная миелома, инсулиноподобный фактор роста 1-го типа, экспрессия мРНК, множественная лекарственная устойчивость.

*S.S. Shushanov, T.A. Kravcova, A.A. Stavrovskaya***IGF-1 - DEPENDENT EXPRESSION OF MRNA OF GENE *MRP1* AND *LRP* IN HUMAN MULTIPLE MYELOMA CELL LINES***FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow***Abstract**

The role of exogenous insulin-like growth factor type-1 (IGF-1) in the regulation of mRNA expression of genes: *MDR1*, *MRP1*, *BCRP*, *LRP*, responsible for the emergence of MDR, in the three cell lines of human MM: RPMI1640, RPMI8226, and IM9 were investigated. These cell lines were cultured in serum-free medium in the presence and absence of exogenous IGF-1 levels within 72 hours, and then using the RT-PCR investigated the mRNA expression of MDR genes. It was shown that the exogenous IGF-1 added at the physiological concentrations in to the cell line RPMI8226 negatively regulate the expression of mRNA: *MRP1* and *LRP*, and did not affect the mRNA expression of the gene *BCRP*. Expression of *MDR1* mRNA in this cell line is not detected initially. In two other cell lines MM: RPMI1640 and IM9 exogenous IGF-1 had no effect on mRNA expression of *MDR* genes studied.

Key words: multiple myeloma, insulin-like growth factor type-1, mRNA expression, multidrug resistance.

Введение

ММ – лимфопролиферативное заболевание, морфологическим субстратом которого являются плазматические клетки, продуцирующие моноклональный иммуноглобулин. Одним из злокачественных свойств клеток ММ является их способность мигрировать и локализоваться в костном мозге, где они пролиферируют и секретируют моноклональный иммуноглобулин (М-белок), а также активируют остеокласты, которые разрушают костную ткань [1]. Длительность жизни больных в основном зависит от чувствительности к лечению противоопухолевыми препаратами, среди которых алкилирующие соединения (мелфалан, циклофосамид, хлорбутин и другие), доксорубин, бортезомиб (велкейд) [5]. Со временем у многих больных ММ развивается устойчивость к самым разным химиопрепаратам, различающимся и по химической струк-

туре, и по механизму действия. Иными словами, возникает множественная лекарственная устойчивость [2; 3]. Одним из хорошо охарактеризованных на сегодняшний день молекулярных механизмов МЛУ опухолей человека является повышенная активность Pgp, кодируемого геном *MDR1*. Pgp является трансмембранным белком и работает по принципу насоса, который, используя энергию АТФ, выбрасывает из клетки лекарственные препараты. То есть, чем большее количество этого белка в мембране клетки, тем больше лекарства выбрасывается из клетки и, как результат, более высокая устойчивость клетки к лекарственным препаратам [2; 3]. Р. Sonneveld и соавт. показали, что у нелеченных больных ММ экспрессия Pgp обнаруживается только в 1–2 % образцов биопсий, тогда как у леченных больных, у которых возник рецидив и они стали нечувствительными к химиопрепаратам, экспрессия Pgp обнаруживается в 40–80 % случаев [21].

Синтез белка Pgp регулируется на уровне транскрипции его мРНК то есть, чем больше в клетке мРНК гена *MDR1*, тем больше в мембране, окружающей клетку, белка Pgp.

Наряду с Pgp в МЛЮ вовлечены также и другие известные на сегодняшний день белки: АТФ-зависимые транспортеры *MRP1*, *BCRP*, а также белок *LRP*, экспрессия которых также регулируется на уровне транскрипции их мРНК [2; 3; 7].

Несмотря на то, что сегодня созданы различные классы ингибиторов, которые в основном являются конкурентами субстратов перечисленных выше белков-транспортеров, их действие в преодолении МЛЮ пока недостаточно эффективно, и в некоторых случаях такие ингибиторы вызывают сильные негативные побочные эффекты [11]. Поэтому наряду с дальнейшим совершенствованием уже имеющихся ингибиторов и поиском новых классов и типов ингибиторов МЛЮ, которые были бы с одной стороны более эффективными, а с другой – универсальными для всех белков-транспортеров и не имели бы побочных эффектов, необходимо параллельно проводить фундаментальные исследования молекулярных механизмов регуляции экспрессии и активации самих белков МЛЮ. Предварительные экспериментальные данные позволяют высказать гипотезу о том, что лекарственная устойчивость клеток ММ может возникать при взаимодействии между В-клеточным опухолевым клоном и микроокружением костного мозга, которое состоит из экстраклеточного матрикса, клеток стромы и других клеток. Показано, что взаимодействие клеток ММ с клетками стромы костного мозга активирует в последних транскрипцию и секрецию цитокинов и ростовых факторов, в том числе и инсулиноподобного фактора роста 1 типа, который, как было установлено, не только усиливает пролиферацию, выживание и миграцию клеток ММ, но также участвует в механизмах возникновения резистентности к общепринятым химиопрепаратам [13; 16]. Вместе с тем роль IGF-1 и его рецепторов в возникновении МЛЮ при ММ на сегодня не изучена. В данной работе мы поставили перед собой цель исследовать роль экзогенного IGF-1 в регуляции экспрессии мРНК генов *MDR1*, *MRP1*, *BCRP*, *LRP*, ответственных за МЛЮ при ММ в трех линиях клеток ММ человека: RPMI1640, RPMI8226 и IM9.

Материалы и методы

Линии клеток ММ и IGF-1

В работе были использованы три типа суспензионных линий клеток множественной миеломы человека, экспрессирующие на своей поверхности указанные в скобках маркеры дифференцировки: IM-9 (CD¹³⁸⁺, CD³⁸⁺, CD⁴⁵⁺, CD⁵⁶⁺, CD¹⁹⁺), RPMI 8226 (CD¹³⁸⁺, CD³⁸⁺, CD⁴⁵⁺, CD⁵⁶⁺, CD¹⁹⁺), RPMI 1640 (CD¹³⁸⁺, CD³⁸⁺, CD⁴⁵⁺, CD⁵⁶⁺, CD¹⁹⁺) [14]. Происхождение указанных линий клеток: человек, костный мозг, миелома. Способ культивирования: суспензионный в среде RPMI-1640 с 10 %-ной ТЭС при 37 °C, 5 % CO₂. В экспериментах использовался человеческий рекомбинантный IGF-1 (Millipore).

Выделение РНК из клеток ММ и ОТ-ПЦР

Для выделения тотальной РНК использовали Trizol (“Sigma”, США). Процедуру выделения РНК проводили согласно стандартному протоколу. Электрофорез выделенной РНК проводили в 1 %-ном агарозном геле при напряжении 100 Вольт в течение 30–40 мин. Качество выделенной РНК оценивали по наличию полос рибосомальной РНК. Концентрацию

РНК определяли по оптическому поглощению при λ 260 нм. Экспрессию мРНК исследуемых генов определяли полуколичественным методом ОТ-ПЦР. Реакционная смесь для синтеза кДНК содержала 2 мкг тотальной клеточной РНК, 4 мкл “случайных” (гексануклеотиды) праймеров (фирма “Литех”, Россия), 1 мкл 25 mM dNTP (“MBI Fermentas”), 2–4 ед. ингибитора РНКаз (“MBI Fermentas”), 100 ед. обратной транскриптазы M-MuLV (“MBI Fermentas”). Объем смеси составлял 25 мкл. Синтез кДНК с матрицы РНК проводили на амплификаторе “Терцик” (“ДНК-технология”, Россия) со следующими параметрами: обратная транскрипция – 42 °C, 50 мин; денатурация – 94 °C, 5 сек. Для наработки продуктов ПЦР составляли реакционную смесь, содержащую: 1 мкл раствора кДНК; 20 пкмоль каждого из праймеров; 1 мкл 25 mM dNTP (“MBI Fermentas”); 2,5 мкл 10-кратного буфера с (NH₄)₂SO₄ (“MBI Fermentas”), 25 mM MgCl₂; 1 ед. Taq-ДНК полимеразы; H₂O до конечного объема 25 мкл; минерального масла – 30 мкл. Нуклеотидные последовательности использованных специфических праймеров приведены в таблице. Реакцию амплификации проводили на амплификаторе “Терцик” (“ДНК-технология”, Россия) по следующей схеме: денатурация – 94 °C, 10 сек; аннилинг – T_m, 10 сек; синтез – 72 °C, 20 сек. значения температуры T_m и количество циклов ПЦР для каждого из генов приведены в таблице. В качестве внутреннего контроля для оценки количества взятой в реакцию РНК определяли экспрессию *GAPDH*. Продукты реакции ОТ-ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2 %-ном агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Размеры фрагментов оценивали в соответствии с расположением полос маркерной ДНК, гель фотографировали при ультрафиолетовом возбуждении с помощью цифровой камеры “Samsung CCTV LENZ”.

Результаты и обсуждение

IGF-1 оказывает свой биологический эффект через связывание и активацию его рецептора IGF-1R, который является рецепторной тирозин киназой, гетеротетрамером, состоящим из двух внеклеточных α -субъединиц, связывающихся с IGF-1, и двух внутриклеточных β -субъединиц, содержащих тирозин киназный домен.

Связывание IGF-1 с IGF-1R приводит к активации внутренней тирозин киназы IGF-1R и последующему аутофосфорилированию тирозинов внутриклеточной β -субъединицы, включая околосмембранный тирозин в положении 950, тирозины в тирозин киназном домене в положениях 1131; 1135 и 1136, и тирозины в С-концевом домене в положениях 1250; 1251 и 1316 [18]. Фосфорилированный тирозин в положении 950 служит сайтом связывания для субстратов IGF-1R, включающих IRS(1-4), Shc, JAK-1, Jak-2.

После связывания и последующего фосфорилирования, перечисленные субстраты инициируют передачу сигналов от IGF-1R внутрь клетки посредством активирования целого ряда нижележащих эффекторов [12]. IGF-1 также может связываться и активировать изоформу А рецептора инсулина (IR-A) [17], а также гибридный рецептор IGF-1R/IR-A [20; 22].

В первой части исследования мы исследовали экспрессию мРНК *IGF-1R*, *IR-A* и *IR-B* (А и В изоформы рецептора инсулина) в трех линиях культур клеток ММ человека: RPMI1640, RPMI8226, IM-9 (рис. 1). Экспрессия мРНК *IGF-1R* была выраженной

во всех трех линиях клеток ММ. Экспрессия мПНК *IR-A* была высокой в линиях клеток RPMI1640 и RPMI8226, а в линии клеток IM9 – слабой. мПНК *IR-B* не выявлялась ни в одной из трех линий клеток ММ. Таким образом, во всех трех линиях клеток ММ экспрессировались мПНК *IGF-1R* и мПНК *IR-A*, и не экспрессировалась мПНК *IR-B*. Поскольку в исследованных линиях клеток ММ мы выявили экспрессию мПНК *IGF-1R* и *IR-A* (рис. 1), можно полагать, что возможны три типа лиганд-рецепторных взаимодействий: IGF-1/IGF-1R, IGF-1/IGF-1R/IR-A, IGF-1/IR-A.

Во второй части исследования методом ОТ-ПЦР мы охарактеризовали экспрессию мПНК генов *MDR1*, *MRP1*, *LRP* и *BCRP* (рис. 2). Мы показали, что мПНК перечисленных генов экспрессируются во всех трех линиях культур клеток ММ человека: RPMI1640, RPMI8226 и IM9 (рис. 2). Уровень экспрессии мПНК гена *MDR1* является высоким только в линии клеток IM-9, а в клетках RPMI1640 и RPMI8226 экспрессия мПНК гена *MDR1* является чрезвычайно слабой, практически на уровне чувствительности метода ОТ-ПЦР. В то же время, в линии клеток IM9 мПНК генов *LRP* и *BCRP* экспрессируются слабее, чем в линиях клеток RPMI1640 и RPMI8226. Экспрессия мПНК гена *MRP1* во всех перечисленных линиях культур клеток примерно одинакова. Таким образом, две линии клеток ММ: RPMI1640 и RPMI8226 являются очень похожими между собой по экспрессии мПНК генов: *MDR1*, *MRP1*, *LRP* и *BCRP* и отличаются от линии клеток IM9, в которых наблюдается очень высокая экспрессия мПНК *MDR1* и низкая, по сравнению с клетками RPMI1640 и RPMI8226, экспрессия мПНК *LRP* и *BCRP* (рис. 2).

В следующей части работы в линиях клеток ММ человека RPMI1640, RPMI8226 и IM9 мы исследовали роль экзогенного IGF-1 в регуляции экспрессии мПНК генов *MDR1*, *MRP1*, *LRP* и *BCRP* (рис. 3). С этой целью указанные линии клеток ММ культивировали в течение 72 ч в среде без сыворотки в присутствии и отсутствии IGF-1 в концентрации 20 нг/мл, что соответствует его физиологической концентрации в сыворотке крови человека. В ходе эксперимента мы обнаружили, что в линии клеток RPMI8226 присутствие экзогенного IGF-1 приводит к выраженному ингибированию экспрессии мПНК генов *LRP* и *MRP1*, а в линии клеток RPMI1640 – к незначительному ингибированию экспрессии мПНК *MRP1* (рис. 3). В линии клеток IM9 IGF-1 не изменяет экспрессию мПНК исследованных генов *MDR*.

На следующем этапе в указанных линиях клеток ММ мы исследовали экспрессию мПНК рецепторов *IGF-1R* и *IR-A* в присутствии и отсутствии IGF-1 (рис. 4). Мы обнаружили, что в линии клеток RPMI8226 экзогенный IGF-1 ингибирует экспрессию мПНК рецепторов *IGF-1R* и *IR-A*, и это четко коррелирует с заметным уменьшением в этой линии клеток количества мПНК генов *LRP* и *MRP1* (рис. 3). В линии клеток RPMI1640 экзогенный IGF-1 также ингибирует экспрессию мПНК *IR-A* и незначительно ингибирует экспрессию мПНК *IGF-1R* (рис. 4), что коррелирует с незначительным уменьшением экспрессии мПНК *MRP1* (рис. 3). В линии клеток IM9 экзогенный IGF-1 не ингибирует экспрессию мПНК рецепторов *IGF-1R* и *IR-A*, и экспрессия мПНК исследованных генов МЛЮ также не изменяется. Таким образом, из трех взятых линий клеток ММ человека, две линии: RPMI1640 и RPMI8226 оказались чувствительными к IGF-1, и

присутствие этого фактора приводит к ингибированию экспрессии мПНК рецепторов *IGF-1R* и *IR-A*, и это в свою очередь коррелирует с ингибированием экспрессии мПНК *MRP1* и *LRP*. Полученные нами данные предполагают следующую последовательность событий: в клетках RPMI8226 и RPMI1640 экзогенный IGF-1 ингибирует экспрессию мПНК рецепторов *IGF-1R* и *IR-A*, в результате этого уменьшается количество рецепторов IGF-1R и IR-A на поверхности клеток ММ, что приводит к уменьшению числа IGF-1/IGF-1R и IGF-1/IR-A взаимодействий и, как следствие, это приводит к инактивации нижележащих сигнальных путей в клетке, которые участвуют в регуляции экспрессии мПНК гена *LRP* и *MRP1*. Учитывая тот факт, что ингибирование экспрессии мПНК рецепторов *IGF-1R* и *IR-A* (в клетках RPMI8226) приводит к выраженному ингибированию экспрессии мПНК *LRP* и *MRP1*, а ингибирование экспрессии мПНК рецептора *IR-A* (в клетках RPMI1640) – к незначительному ингибированию экспрессии мПНК *MRP1* можно предположить, что в регуляции экспрессии мПНК *LRP* и *MRP1* участвует IGF-1/IGF-1R сигнальный путь, а IGF-1/IR-A сигнальный путь не является решающим. Ни в одной из трех линий клеток ММ экспрессия мПНК *BCRP* и мПНК *MDR1* в присутствии IGF-1 не изменялась. Экспрессия мПНК гена *MDR1* в клетках RPMI1640 и RPMI8226 является изначально чрезвычайно слабой (рис. 2), поэтому судить о роли экзогенного IGF-1 в регуляции экспрессии мПНК гена *MDR1* в этих клетках не представляется возможным.

IGF-1-зависимая негативная регуляция экспрессии мПНК *IGF-1R* была описана в литературе ранее. Например, в экспериментах *in vitro* в мышечных клетках мыши C2C12 и в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y было показано, что IGF-1 негативно регулирует экспрессию мПНК *IGF-1R* на уровне транскрипции и не влияет на стабильность мПНК *IGF-1R*. Вместе с тем, IGF-1 респонсивные элементы в промоторной области гена *IGF-1R* не выявлены [12]. В нашей работе мы впервые показали, что в линии клеток ММ человека RPMI8226 экзогенный IGF-1 негативно регулирует экспрессию мПНК *IGF-1R* и мПНК *IR-A*, а в линии клеток RPMI1640 экзогенный IGF-1 негативно регулирует экспрессию мПНК *IR-A*.

На сегодня в литературе имеется не так много работ, посвященных исследованию роли IGF-1 и его рецептора IGF-1R в регуляции экспрессии генов, ответственных за МЛЮ. Было показано, что в клетках рака толстой кишки мыши линии MCLM и в Т-лимфобластных клетках линии человека CCRF-CEM IGF-1 индуцировал экспрессию гена *MDR1* и значительно ингибировал гибель клеток от цитотоксических препаратов [10; 19]. В работе J. Ge и соавт. методом иммуногистохимии исследовали экспрессию IGF-1R и *MRP1* в 102 образцах больных раком желудка и обнаружили, что IGF-1R экспрессировался в 75,2 % случаев, а *MRP1* – в 69 % случаев. Такая высокая степень корреляции в экспрессии этих генов, несмотря на химиотерапию, ассоциировалась с плохим прогнозом у больных раком желудка [9].

В работе P. Maiso и соавт. показано, что ингибирование тирозин киназной активности IGF-1R усиливает действие леналидомида, дексаметазона, мелфалана и бортезомиба, а использование ингибитора тирозин киназной активности IGF-1R совместно с дексаметазоном и бортезомибом заметно подавляет рост клеток ММ *in vitro* [6].

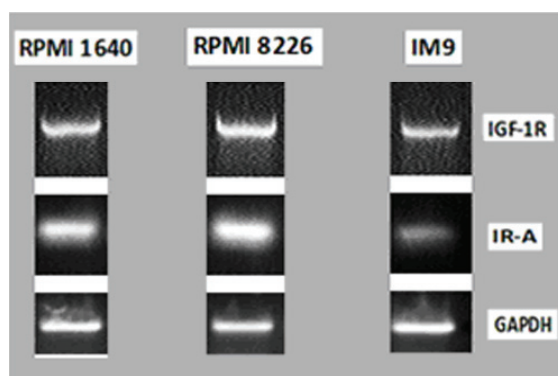


Рис. 1. Экспрессия мРНК рецепторов IGF-1: IGF-1R и IR-A в линиях клеток ММ человека: RPMI1640, RPMI8226, IM9 в среде с 10%-ной ТЭС.

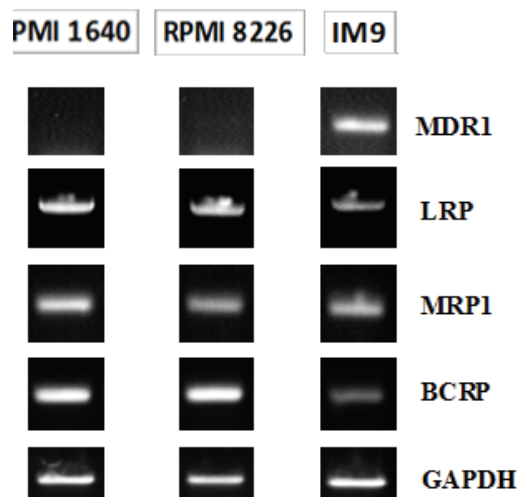


Рис. 2. Экспрессия мРНК генов, обуславливающих MDR, в линиях культур клеток ММ человека: RPMI1640, RPMI8226, IM9 в среде с 10%-ной ТЭС.

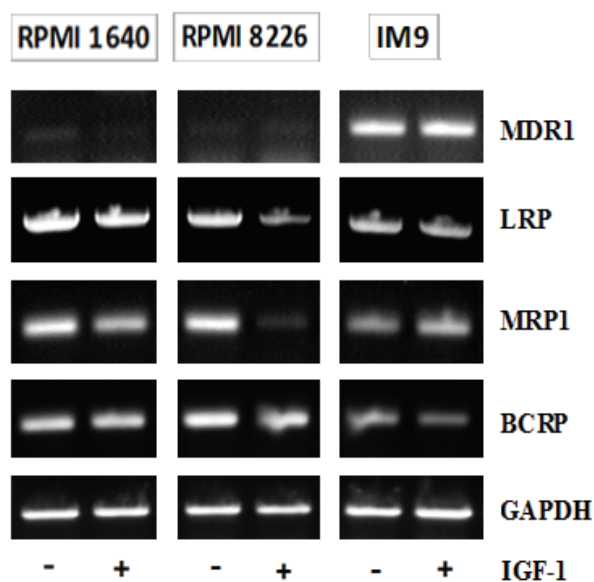


Рис. 3. Экспрессия мРНК генов, обуславливающих MDR, в линиях культур клеток ММ человека: RPMI1640, RPMI8226, IM9 в среде без сыворотки, в присутствии и в отсутствие экзогенного IGF-1.

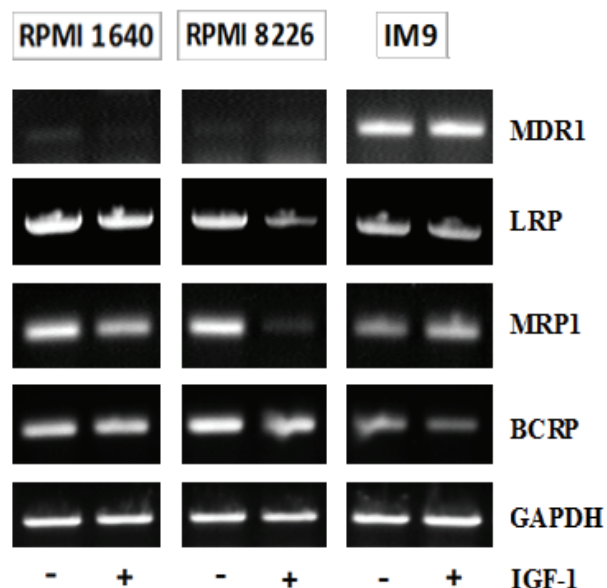


Рис. 4. Экспрессия мРНК рецепторов IGF-1: IGF-1R и IR-A в линиях клеток ММ человека: RPMI1640, RPMI8226, IM9 в среде без сыворотки, в присутствии и в отсутствие экзогенного IGF-1.

Таблица

Нуклеотидные последовательности специфичных праймеров к генам, размер продукта, температура отжига праймеров и количество циклов, используемых в ПЦР

Ген	Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Размер продукта, пары оснований	Темп-ра отжига праймера
MDR1	MDR1-F MDR1-R	5'-CCCATCATTGCAATAGCAGG-3' 5'-GTTCAAACCTCTGCTCCTGA-3'	167 п.о.	60°C
MRP1	MRP1-F MRP1-R	5'-ATCAAGACCGCTGTCATTGG-3' 5'-GAGCAAGGATGACTTGCAAG-3'	180 п.о.	60°C
BCRP	BCRP-F BCRP-R	5'-TGCCAGGACTCAATGCAACAG-3' 5'-ACAATTTCAGGTAGGCAATTGTG-3'	172 п.о.	60°C
LRP	LRP-F LRP-R	5'-CCCCATACCACTATATCCATGTG-3' 5'-TCGAAAGCCACTGATCTCCTG-3'	405 п.о.	60°C
IR-A	IRA-F IRA-R	5'-AAC CAG AGT GAG TAT G AG GAT-3' 5'-CCG TTC CAG AGC GA AG TG CTT-3'	600 п.о.	60°C
IR-B	IRB-F IRB-R	5'-AAC CAG AGT GAG TAT G AG GAT-3' 5'-CCG TTC CAG AGC GA AG TG CTT-3'	636 п.о.	60°C
IGF-IR	IGF-IR-F IGF-IR-R	5'-ATTGAGGAGGTCACAGAGAAC-3' 5'-TTCATATCCTGTTTGGCCTG-3'	755 п.о.	67°C
GAPDH	GAPDH-F GAPDH-R	5'-CCCCTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTT-3' 5'-GGCCATGAGGTCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	513 п.о.	60°C

Недавно в аспиратах костного мозга, полученных от больных ММ, нами была сопоставлена экспрессия двух изоформ мРНК гена инсулиноподобного фактора роста 1-го типа *IGF-1A* и *IGF-1B* с экспрессией мРНК генов, ответственных за МЛЮ: *MDR1*, *MRP1*, *LRP*, *BCRP*. В ходе исследования было выявлено, что обе изоформы мРНК гена *IGF-1* в подавляющем большинстве случаев экспрессировались в тех же образцах, в которых гиперэкспрессировалась мРНК *MDR1* и *LRP*, причем, степень коэкспрессии изоформ мРНК *IGF-1* и мРНК *MDR1* составила 90 %, а изоформ мРНК *IGF-1* и мРНК *LRP* – 87,5 % [4].

Таким образом, в своей работе мы впервые показали, что в линии клеток RPMI8226 экзогенный IGF-1, добавленный в культуральную среду в физиологических концентрациях, ингибировал экспрессию мРНК рецепторов *IGF-1R* и *IR-A* (А изоформы рецептора инсулина), и это коррелировало с ингибированием экспрессии мРНК *MRP1* и *LRP*. В другой линии клеток RPMI1640 экзогенный IGF-1 также ингибировал экспрессию мРНК *IR-A* и незначительно ингибировал экспрессию мРНК *IGF-1R*, что приводило к незначительному уменьшению экспрессии мРНК *MRP1*. В линии клеток IM9 экзогенный IGF-1 не влиял на экспрессию мРНК рецепторов *IGF-1R* и *IR-A* и в присутствии IGF-1 экспрессия мРНК исследованных генов МЛЮ не изменялась.

Возможно, что IGF-1-зависимая регуляция экспрессии генов, ответственных за МЛЮ, зависит от свойств самих клеток множественной миеломы. Например, в пока еще неопубликованной работе, мы показали, что клетки RPMI8226, в отличие от двух других линий клеток RPMI1640 и IM9, хорошо выживали и быстрее размножались в среде без сыворотки в течение 72 ч. Также клетки RPMI8226 отличались от двух других исследованных линий клеток тем, что экспрессировали мРНК *IGF-2* (инсулиноподобный фактор роста 2 типа). Ранее было показано, что IGF-2 взаимодействует и с рецептором IGF-1R, и с рецептором IR-A, и активирует размножение клеток [8; 15]. Также не исключено, что экспрессия мРНК различных белков-транспортеров, участвующих в возникновении МЛЮ, регулируются различным образом, и, возможно, что в их регуляции участвуют межклеточные взаимодействия, различные факторы роста и их рецепторы и активируемые ими сигнальные пути, мишенями которых являются промоторные регионы генов МЛЮ. На эти и другие вопросы нам предстоит ответить в ходе наших дальнейших экспериментальных работ в этом направлении.

Литература

1. Вотякова О.М., Демина Е.А. Множественная миелома / Клиническая Онкогематология. – Руководство для врачей под редакцией профессора Волковой М.А. (Издание второе, переработанное и дополненное). – М.: Медицина, 2007. – С. 847–73.
2. Ставровская А.А. Множественная лекарственная устойчивость, обусловленная активностью транспортных белков клетки: некоторые новые факты и перспективы исследований // Биологические мембраны. – 2003. – 20(3). – С. 196–205.
3. Ставровская А.А. Опухолевая клетка в обороне // Соровский образовательный журнал. – 2001. – 7(7). – С. 17–23.
4. Шушианов С.С., Марьина Л.Г., Черных Ю.Б. и др. Коэкспрессия мРНК генов систем IGF/инсулин и множественной лекарственной устойчивости у больных множественной миеломой // Клиническая Онкогематология. – 2010. – Т. 3, № 2. – С. 105–13.
5. Anderson S.K., Kyle R.A., Dalton W.S. et al. Multiple Myeloma: New Insights and Therapeutic Approaches // Hematology. – 2000. – 2000(1). – P. 147–65.
6. Baserga R., Rubin R. Cell cycle and growth control // Crit Rev Eukaryot Gene Expr. – 1993. – 3(1). – P. 47–61.
7. Dean M. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily // Bookshelf ID: NBK3. – 2002. – P. 1–50.

Заключение

Исследование механизмов возникновения лекарственной устойчивости к химиопрепаратам, применяемым при лечении больных ММ, является на сегодня одним из актуальных направлений в экспериментальной онкологии.

В этой работе мы исследовали роль экзогенного инсулиноподобного фактора роста 1 типа (IGF-1) в регуляции экспрессии мРНК генов *MDR1*, *MRP1*, *BCRP*, *LRP*, ответственных за возникновение МЛЮ, в трех линиях клеток множественной миеломы человека: RPMI1640, RPMI8226 и IM9. Мы впервые показали, что в линии клеток RPMI8226 экзогенный IGF-1, добавленный в культуральную среду в физиологических концентрациях, ингибировал экспрессию мРНК рецепторов *IGF-1R* и *IR-A* (А изоформы рецептора инсулина) и это коррелировало с ингибированием экспрессии мРНК *MRP1* и *LRP*.

В другой линии клеток RPMI1640 экзогенный IGF-1 также ингибировал экспрессию мРНК *IR-A* и незначительно ингибировал экспрессию мРНК *IGF-1R*, что приводило к незначительному уменьшению экспрессии мРНК *MRP1*. В линии клеток IM9 экзогенный IGF-1 не влиял на экспрессию мРНК рецепторов *IGF-1R* и *IR-A* и в присутствии IGF-1 экспрессия мРНК исследованных генов МЛЮ не изменялась.

Таким образом, из трех взятых линий клеток ММ человека две: RPMI1640 и RPMI8226 – оказались чувствительны к IGF-1, и присутствие этого фактора приводило к ингибированию экспрессии мРНК рецепторов *IGF-1R* и *IR-A*, и это в свою очередь коррелировало с ингибированием экспрессии мРНК *MRP1* и *LRP*.

Мы предполагаем, что уменьшение количества рецепторов IGF-1R и IR-A на поверхности клеток ММ приводит к уменьшению числа IGF-1/IGF-1R и IGF-1/IR-A взаимодействий и, как следствие, это приводит к инактивации нижележащих сигнальных путей в клетке, которые участвуют в регуляции экспрессии мРНК генов МЛЮ.

В пользу этого предположения также свидетельствуют наши данные, полученные ранее в экспериментах *in vivo*. Исследования роли IGF-1/IGF-1R и IGF-1/IR-A-зависимых сигнальных путей в регуляции экспрессии генов МЛЮ при ММ нами будут продолжены.

8. Frasca F., Pandini G., Scalia P. *et al.* Insulin receptor isoform A a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells // *Mol Cell Biol.* – 1999. – 19. – P. 3278–88.
9. Ge J., Chen Z., Wu S. *et al.* Expression Levels of Insulin-Like Growth Factor-1 and Multidrug Resistance-Associated Protein-1 Indicate Poor Prognosis in Patients with Gastric Cancer // *Digestion.* – 2009. – 80. – P. 48–158.
10. Guo Y.S., Jin G.F., Houston C.W. *et al.* Insulin-like growth factor-1 promotes multidrug resistance in MCLM colon cancer cells // *J Cell Physiol.* – 1998. – 175(2). – P. 141–8.
11. Hatok J., Račay P., Hudeček J. *et al.* Genes of multidrug resistance in haematological malignancies // *Biologia, Bratislava.* – 2006. – 61(3). – P. 247–56.
12. Hernandez-Sanchez C., Werner H., Roberts C.T. *et al.* Differential Regulation of Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) Receptor Gene Expression by IGF-I and Basic Fibroblastic Growth Factor // *JBC.* – 1997. – 272(8). – P. 4663–70.
13. Hideshima T., Bergsagel P.L., Kuehl W.M. *et al.* Advances in Biology of Multiple Myeloma: Clinical Applications // *Blood.* – 2004. – DOI 10.1182/blood. -2004.-01-0037. For personal use only.
14. Kalitin N., Kostjukova M., Kakpakova E. *et al.* Vascular endothelial growth factor 1 (VEGFR1) gene expression depends on immunophenotype of human multiple myeloma cells // *Eur J Cancer.* – 2011. – 47(1). – P. S644.
15. Leibiger B., Leibiger I.B., Moede T. *et al.* Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic b cells // *Molecular Cell.* – 2001. – 7. – P. 559–70.
16. Mitsiades C.S., Mitsiades N., Kung A.L. *et al.* The IGF/IGF-1R system is a major therapeutic target for multiple myeloma, other hematologic malignancies and solid tumors // *Blood.* – 2002. – P. 100–170a.
17. Sacco A., Morcavallo A., Pandini G. *et al.* Differential signaling activation by insulin and insulin-like growth factors I and II upon binding to insulin receptor isoform A // *Endocrinology.* – 2009. – 150(8). – P. 3594–602.
18. Samani A.A., Yakar S., LeRoith D. *et al.* The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: Overview and recent insights // *Endocrine Reviews.* – 2007. – 28. – P. 20–47.
19. Schwarze C.P., Neu S., Beck J. *et al.* Influence of IGF-I and Cell Density on MDR1 Expression in the T-Lymphoblastoid Cell Line CCRF-CEM // *Horm Res.* – 1999. – 52. – P. 192–9.
20. Slaaby R., Schaffer L., Lautrup-Larsen I. *et al.* Hybrid receptors formed by insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) have low insulin and high IGF-1 affinity irrespective of the IR splice variant // *J Biol Chem.* – 2006. – 281. – P. 25869–74.
21. Sonneveld P. Multidrug resistance in haematological malignancies // *J. Int. Med.* – 2000. – 247. – P. 521–34.
22. Soos M.A., Field C.E., Siddle K. *et al.* Purified hybrid insulin/insulin-like growth factor-I receptors bind insulin-like growth factor-I, but not insulin, with high affinity // *Biochem J.* – 1993. – 290. – P. 419–26.

Список сокращений

IGF-1	–	insulin-like growth factor 1 (инсулиноподобный фактор роста 1-го типа)
MM	–	multiple myeloma
Pgp	–	белок Р-гликопротеина
МЛУ (MDR)	–	множественная лекарственная устойчивость (multidrug resistance)
ММ	–	множественная миелома

УДК 616.345-006.6-071:575.117

О.В. Уткин^{1,2}, Н.А. Сахарнов¹, Н.Б. Преснякова², Д.В. Новиков¹, А.В. Алясова³,
В.В. Новиков^{1,2}, А.Ю. Барышников⁴

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА CD95/FAS В КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ТОЛСТОЙ КИШКИ

¹НИИ молекулярной биологии и региональной экологии ФГБОУ ВПО Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

²ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород

³ФГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия Росздрава, Нижний Новгород

⁴ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

Контактная информация

Уткин Олег Владимирович, ведущий научный сотрудник

адрес: 603006, г. Нижний Новгород, ул. Ошарская, 8Д; тел: +7 (831) 419-90-64

e-mail: utkino2004@mail.ru

Статья поступила: 21.01.2013, принята к печати 01.02.2013

Резюме

Цель данного исследования – анализ экспрессии гена *CD95/Fas* в крови при РТК. С помощью метода ОТ-ПЦР показано, что во всех образцах крови здоровых волонтеров и больных РТК выявлялась мРНК мембранной формы (mFas) и мРНК доминирующей растворимой формы (sFasTMDel). У больных РТК встречаемость минорных форм мРНК *CD95/Fas* варьировала, но снижалась по сравнению с нормой вне зависимости от клинических особенностей заболевания. Используя разработанный нами мультиплексный вариант ОТ-ПЦР в реальном времени, показано, что уровень представленности мРНК mFas и мРНК sFasTMDel разнонаправленно флуктуировал на разных стадиях РТК. У больных без метастазов изменения в уровнях мРНК mFas и мРНК sFasTMDel были более выражены, чем у больных с метастазами. Обнаружено, что уровень мРНК обоих вариантов *CD95/Fas* повышался по мере увеличения степени агрессивности опухоли. Значения этого показателя были самыми низкими при высокодифференцированной гистологической форме РТК и достигали самых высоких значений при низкодифференцированной гистологической форме заболевания. С помощью ИФА определяли сывороточный уровень суммарной и олигомерной фракций растворимого *CD95/Fas* (sCD95/sFas). Выявлено, что сывороточное содержание обеих фракций sCD95/sFas превышало значения нормы вне зависимости от клинических особенностей заболевания.

Ключевые слова: апоптоз, *CD95/Fas*, мРНК, уровень экспрессии, альтернативный сплайсинг, рак толстой кишки.

O.V. Utkin^{1,2}, N.A. Sakharov¹, N.B. Presnyakova², D.V. Novikov¹, A.V. Alyasova³,
V.V. Novikov^{1,2}, A.Y. Baryshnikov⁴

EXPRESSION OF CD95/FAS IN BLOOD CELLS AT COLORECTAL CANCER

¹Institute of Molecular Biology and Regional Ecology N. I. Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod – National Research University, Nizhny Novgorod

²I.N. Blokhina Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod

³Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod

⁴FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow

Abstract

The purpose of this researching is the analysis of *CD95/Fas* expression in blood at colorectal cancer. By PCR with reverse transcription was revealed that mRNA of membrane form (mFas) and mRNA of dominant soluble form (sFasTMDel) were detected in all samples of blood of healthy donors and colorectal patients. Frequency of occurrence of minor forms of *CD95/Fas* mRNA in samples of colorectal patients varied but it decreased in comparison with norm independently of clinical features of cancer. Using multiplex variant of real-time PCR with reverse transcription that we developed, was revealed that expression level of mFas mRNA and sFasTMDel mRNA differently fluctuated on different stages of colorectal cancer. Alterations in expression level of mFas mRNA and sFasTMDel mRNA were more pronounced in samples of patients without metastasis than patients with metastasis. We detected that expression level of mRNA of both variants *CD95/Fas* increased according as malignancy degree of cancer increased. Values of this index were the lowest at high-differentiated histological form of colorectal cancer and were the highest at low-differentiated histological form of cancer. By immunoassay we detected serum level of summary and oligomeric fractions of soluble *CD95/Fas* (sCD95/sFas). Was revealed that serum level of both fractions sCD95/sFas exceeded the normal values independently of clinical features of cancer.

Key words: apoptosis, *CD95/Fas*, mRNA, expression level, alternative splicing, colorectal cancer.

Введение

В регуляции апоптотических процессов и иммунного ответа принимает участие представитель белкового семейства «рецепторов смерти» – *CD95/Fas*.

Особенностью экспрессии гена *CD95/Fas* является высокое разнообразие форм мРНК, образующихся в результате альтернативного сплайсинга. Среди них выделяют мембранную (mFas), доминирующую растворимую (sFasExo6Del/sFasTMDel) и несколько

минорных растворимых форм, образующихся в результате делеций одного или нескольких экзонов [6; 15]. Они выполняют разные функции в клетке. Как правило, мембранная форма CD95/Fas участвует в инициации апоптоза [1; 5]. Функциональная направленность растворимых форм обусловлена их структурной организацией. Мономерная растворимая форма CD95/Fas (sCD95/sFas) блокирует передачу сигнала смерти, а его олигомерная форма проявляет проапоптотическую активность [9; 17]. Минорные растворимые формы участвуют в регуляции экспрессии доминирующей растворимой формы [6; 7]. Изменение экспрессии гена *CD95/Fas* может сопровождаться возникновением разных по составу и уровню представленности мРНК спектров, а также флуктуацией сывороточного содержания отличающихся по структуре и функциям фракций sCD95/sFas. Такая ситуация в отношении мембранных и растворимых форм CD95/Fas вносит вклад в изменение баланса сигналов выживания/гибели уже на начальных этапах апоптоза, приводя к модуляции иммунного ответа, и может играть важную роль в патогенезе онкологических заболеваний. Широкая распространенность и разнообразие клинических форм РТК делают актуальным все стороннее изучение молекулярных механизмов иммунного ответа при данном заболевании.

Целью настоящей работы явилась оценка экспрессии гена *CD95/Fas* в образцах цельной крови у больных раком толстой кишки.

Материалы и методы

Материалом исследования явились образцы цельной периферической крови и образцы сыворотки крови 39 больных РТК с разными гистологическими формами опухоли (19 мужчин и 20 женщин), проходивших лечение в Нижегородском областном онкологическом диспансере. УДГФ РТК регистрировалась у 26 пациентов, НДГФ регистрировалась у 6 больных, ВДГФ – у 7 из 39 пациентов. У 9 из 39 больных была установлена I стадия заболевания, у 17 – II стадия, у 9 – III стадия, у 4 – IV стадия. Метастазы были зарегистрированы у 13 из 39 пациентов. В качестве контроля использовали образцы крови и сыворотки крови 59 здоровых волонтеров (45 женщин и 14 мужчин).

Выделение мРНК из клеток периферической крови проводили с использованием фенол-хлороформенной экстракции [10]. Оценку спектра форм мРНК CD95/Fas проводили с помощью разработанного ранее метода ОТ-ПЦР [2; 7]. Результаты ОТ-ПЦР оценивали методом электрофореза в 2% агарозном геле, содержащем флуоресцентный краситель бромид этидия.

Оценку сывороточного содержания суммарной и олигомерной фракций sCD95/sFas проводили иммуоферментным методом. Для определения сывороточного содержания суммарной фракции sCD95/sFas использовали поликлональные антитела против мононуклеарных клеток периферической крови человека и конъюгированные с пероксидазой корня хрена МКА ИКО-160 [19]. Определение олигомерной фракции sCD95/sFas проводили с помощью очищенных моноклональных антител ИКО-160 и конъюгированных с пероксидазой МКА ИКО-160 [4].

Для детекции уровня представленности мРНК mFas и мРНК sFasTMDel, а также мРНК референтного гена *Ubc* был разработан метод мультиплексной амплификации мРНК mFas, sFasTMDel и *Ubc* в одной пробирке. Общий объем реакционной смеси

составлял 25 мкл. Реакционная смесь содержала 2,5 мкл 10× ПЦР-буфера («Силекс», Москва), 2 мкл раствора дНТФ/dNTF («Силекс», Москва), 0,5 мкл TaqF-полимеразы (ООО «ИнтерЛабСервис», Москва), по 0,5 мкл прямого и обратного праймеров для гена *CD95/Fas* и референтного гена *Ubc* (ЗАО «Синтол», Москва), по 0,5 мкл зондов для выявления кДНК mFas и sFasTMDel, а также для детекции кДНК *Ubc* (ЗАО «Синтол», Москва) и 14,5 мкл бидистиллированной H₂O. В дальнейшем к 23 мкл реакционной смеси добавляли 2 мкл кДНК, полученной в ходе реакции обратной транскрипции, и помещали в анализатор нуклеиновых кислот «АНК-32» (ЗАО «Синтол», Москва). В работе применялся мультиплексный «TaqMan» вариант полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Раздельную детекцию уровня мРНК mFas и мРНК sFasTMDel проводили с помощью модифицированного метода [3] с использованием прямого* и обратного праймеров**, а также специфических для каждой из форм мРНК CD95/Fas олигонуклеотидных зондов*** [7] и**** при следующих температурных условиях: денатурация 94 °С – 30 с, отжиг (гибридизация) 55 °С – 40 с, элонгация 72 °С – 45 с. Общее количество циклов для одного раунда ПЦР составляло 50. Каждое измерение проводили в трех повторях. За уровень представленности мРНК принимали номер цикла амплификации, при котором был зарегистрирован экспоненциальный рост интенсивности флуоресценции – пороговый цикл (C_t). Для нормализации количества внесенной матрицы проводили определение уровня экспрессии референтного гена *Ubc* с использованием прямого***** и обратного***** праймеров, а также олигонуклеотидного зонда***** при тех же температурных условиях, что и для гена *CD95/Fas*.

Для расчета относительного уровня экспрессии гена *CD95/Fas* была использована программа REST [16]. Уровень экспрессии исследуемых генов рассчитывали относительно контроля, принимая величину экспрессии гена в контроле за единицу. Дополнительно рассчитывался коэффициент (K), представляющий собой отношение уровня представленности мРНК mFas к уровню представленности мРНК sFasTMDel ($K = R_{mFas} / R_{sFasTMDel}$). Значения коэффициента K у здоровых волонтеров принимали за единицу.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программы Statistica v. 8.0. Для оценки встречаемости мРНК рассчитывали относительную и абсолютную частоты. Анализ различий относительных частот обнаружения мРНК в группах проводили с использованием критерия сравнения пропорций. Для оценки взаимосвязи изучаемых признаков между собой использовали двусторонний тест точного критерия Фишера и критерий Мак-Немара. Для представления исследованных количественных показателей были использованы медиана, 25 и 75 процентиля. Межгрупповой анализ количественных показателей проводили с использованием непараметрических критериев Манна-Уитни и Крускала-Уоллиса. Для анализа взаимосвязи изучаемых количественных признаков, а также количественных и качественных признаков между собой

* FasF (5'- ATggAATCATCAAggAATgC-3')

** FasR (5'- CTTTCTgTgCTTCTgCATg-3')

*** mFasZ (5'-Rox-AgATCTAACTTggggTggCTTTgTCTTCTT-BHQ2-3')

**** sFasZ (5'-Fam-AgTgCAAAgAggAAGTgAAGAgAAAggAA-3-BHQ1-3')

***** UbcF (5'-CACAgCTAgTTCCgTCgCA-3')

***** UbcR (5'-gAAGATCTgCATTgTCAAT-3')

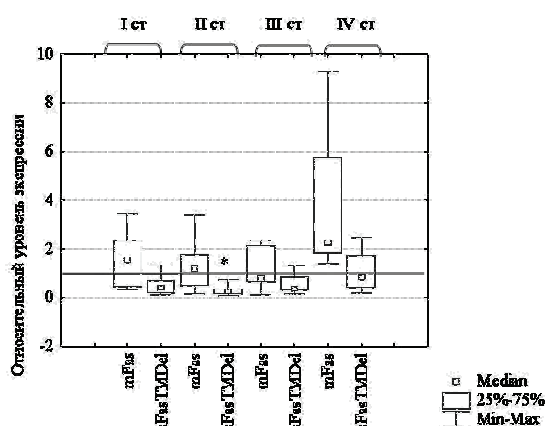
***** UbcZ (5'-R6G-ATTTgggTCgAgTCTTgTTTgTggAT-BHQ1-3')

использовали критерий ранговой корреляции Спирмена. При анализе качественных и количественных признаков различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Экспрессия CD95/Fas в крови на разных стадиях РТК

Проведенные исследования выявили, что относительный уровень мРНК mFas у больных РТК статистически значимо не изменялся в сравнении с контролем, однако наблюдалась тенденция к его снижению от первой к третьей стадии с последующей тенденцией к повышению на 4 стадии. Уровень мРНК sFasTMDel был статистически значимо понижен на 2 стадии заболевания ($p = 0,003$) и имел тенденцию к снижению на остальных стадиях (рис. 1).



*статистически значимые различия по сравнению со здоровыми волонтерами ($p < 0,05$);

Рис. 1. Уровень мРНК mFas и мРНК sFasTMDel в крови больных на разных стадиях РТК: уровень мРНК mFas и мРНК sFasTMDel здоровых волонтеров принят за 1 и изображен в виде горизонтальной линии.

Коэффициент К, представляющий собой отношение уровня мРНК mFas к уровню мРНК sFasTMDel, составил $1,26/0,42 = 3,0$ отн. ед. на I стадии; $0,95/0,25 = 3,8$ отн. ед. на II стадии; $0,80/0,48 = 1,7$ отн. ед. на III стадии и $2,88/0,76 = 3,8$ отн. ед. на IV стадии. На I и II стадиях РТК значения данного коэффициента у онкологических больных были статистически значимо повышены по сравнению с нормой ($p < 0,001$), а на III и IV стадиях заболевания имели тенденцию к повышению.

В крови здоровых волонтеров и больных РТК с различной частотой выявлялись 6 вариантов мРНК CD95/Fas (mFas, sFasTMDel, FasExo4Del, FasExo3,4Del, FasExo4,6Del, FasExo3,4,6Del). У всех здоровых волонтеров и больных РТК детектировалась мРНК mFas и мРНК sFasTMDel. Встречаемость минорных форм мРНК CD95/Fas варьировала как у здоровых волонтеров, так и у больных лиц (табл. 1).

В целом, на всех стадиях рака толстой кишки мРНК минорных форм CD95/Fas выявлялась реже по сравнению со здоровыми волонтерами ($p < 0,05$). На II стадии РТК мРНК FasExo3,4Del, FasExo4,6Del и FasExo3,4,6Del выявлялись статистически значимо чаще, чем мРНК FasExo4Del ($p = 0,005$, $p = 0,020$ и $p = 0,002$, соответственно). На III стадии заболевания мРНК FasExo3,4,6Del выявлялась чаще, чем мРНК FasExo4Del ($p = 0,027$).

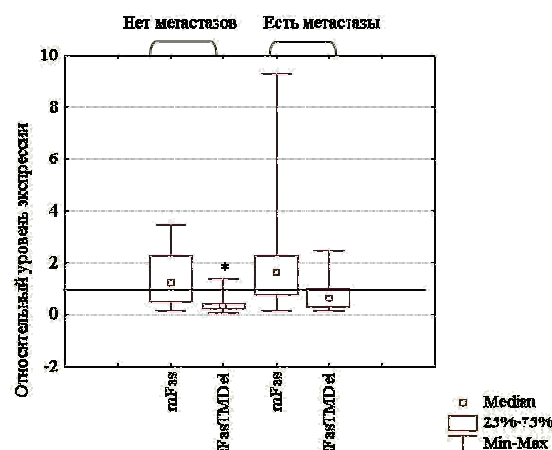
Выявленные особенности транскриптома клеток крови сопоставляли с сывороточным содержанием суммарной и олигомерной фракций sCD95/sFas (табл. 2). Показано, что на всех стадиях РТК сывороточное содержание sCD95/sFas статистически значимо превышало норму в 1,6–2,0 раза для суммарной фракции и в 2,1–2,8 раза для олигомерной фракции ($p < 0,05$).

Корреляционный анализ не выявил статистически значимой связи между уровнем представленности мРНК mFas и мРНК sFasTMDel в крови и сывороточным уровнем суммарной и олигомерной фракций sCD95/sFas.

Экспрессия CD95/Fas

при наличии или отсутствии метастазов

При метастазировании опухоли уровень представленности мРНК mFas и мРНК sFasTMDel в крови статистически значимо не отличался от соответствующих показателей у здоровых волонтеров (рис. 2). Вместе с тем, уровень мРНК mFas имел тенденцию к повышению, а уровень мРНК sFasTMDel имел обратную тенденцию.



*статистически значимые различия по сравнению со здоровыми волонтерами ($p < 0,05$);

Рис. 2. Уровень мРНК mFas и мРНК sFasTMDel при наличии или отсутствии метастазов: уровень мРНК mFas и мРНК sFasTMDel здоровых волонтеров принят за 1.

Отсутствие метастазов характеризовалось нормальным уровнем мРНК mFas и сниженным уровнем мРНК sFasTMDel ($p = 0,002$). У больных с метастазами уровни мРНК mFas и sFasTMDel не менялись. Вне зависимости от наличия или отсутствия метастазов коэффициент К превышал норму ($p < 0,001$). При наличии метастазов значение коэффициента составляло $1,19/0,56 = 2,1$ отн. ед., а при отсутствии метастазов оно составляло величину $1,05/0,30 = 3,5$ отн. ед. То есть при отсутствии метастазов у больных РТК коэффициент К был в 1,7 раза выше, чем у больных с метастазами ($p > 0,05$).

Встречаемость минорных форм мРНК CD95/Fas варьировала у больных РТК при наличии и отсутствии метастазов (табл. 3). При метастазах с наибольшей частотой в крови детектировалась одна минорная форма мРНК, а без метастазов – три минорные формы мРНК. У пациентов с метастазами частота выявления мРНК FasExo3,4,6Del была статистически значимо выше, чем частота обнаружения мРНК FasExo4Del ($p = 0,005$).

Таблица 1

Встречаемость минорных форм мРНК CD95/Fas в крови на разных стадиях РТК

Стадия	Минорные формы			
	FasExo4Del	FasExo3,4De	FasExo4,6Del	FasExo3,4,6Del
I	0/9*	4/9*	2/9*	6/9*
II	1/17*	9/17***	7/17***	10/17***
III	1/9*	3/9*	2/9*	6/9***
IV	1/4*	3/4*	4/4*	4/4*
Здоровые волонтеры	24/59	29/59	59/59	57/59

*статистически значимые различия по сравнению со здоровыми волонтерами ($p<0,05$); **статистически значимые различия по сравнению с FasExo4Del ($p<0,05$)

Таблица 2

Сывороточный уровень суммарной и олигомерной фракций sCD95/sFas на разных стадиях РТК (U/ml)

Фракция sCD95/sFas	Здоровые волонтеры	Стадия			
		I	II	III	IV
Суммарная	204,2 (128,0; 345,9)	330,6 (317,0; 340,2)*	371,0 (321,0; 430,0)*	408,0 (381,0; 764,0)*	327,3 (283,3; 340,0)*
Олигомерная	83,1 (69,3; 129)	175,1 (164,3; 222,3)*	222,1 (164,3; 355,5)*	214,3 (187,2; 234,6)*	229,6 (169,4; 273,4)*

*статистически значимые различия по сравнению со здоровыми волонтерами ($p<0,05$)

Таблица 3

Частота выявления минорных форм мРНК CD95/Fas в крови больных РТК при наличии и отсутствии метастазов

Метастазы	Минорные формы			
	FasExo4Del	FasExo3,4Del	FasExo4,6Del	FasExo3,4,6Del
есть	2/13*	6/13*	6/13*	10/13***
нет	1/26*	13/26***	9/26***	16/26***
Здоровые волонтеры	24/59	29/59	59/59	57/59

*статистически значимые различия по сравнению со здоровыми волонтерами ($p<0,05$);
 **статистически значимые различия по сравнению с FasExo4Del ($p<0,05$);
 ***статистически значимые различия по сравнению с FasExo4,6Del ($p<0,05$)

Таблица 4

Сывороточный уровень суммарной и олигомерной фракций sCD95/sFas у больных с метастазами и без метастазов (U/ml)

Фракция sCD95/sFas	Здоровые волонтеры	Метастазы	
		Есть	Нет
Суммарный	204,2 (128,0; 345,9)	381,0 (319,5; 563,0)*	338,6 (317,0; 430,0)*
Олигомерный	83,1 (69,3; 129)	227,5 (187,2; 234,6)*	204,6 (164,3; 277,3)*

*статистически значимые различия по сравнению со здоровыми волонтерами ($p<0,05$)

Таблица 5

Частота выявления минорных форм мРНК CD95/Fas при разных гистологических формах опухоли

Гистологическая форма	Минорные мРНК			
	FasExo4Del	FasExo3,4Del	FasExo4,6Del	FasExo3,4,6Del
Низкодифференцированная	0/6*	0/6*	0/6*	1/6*
Умереннодифференцированная	4/26*	16/26***	12/26***	22/26*****
Высокодифференцированная	0/7*	3/7*	3/7*	3/7***
Здоровые волонтеры	24/59	29/59	59/59	57/59

*статистически значимые различия по сравнению со здоровыми волонтерами ($p<0,05$);
 **статистически значимые различия по сравнению с FasExo4Del ($p<0,05$);
 ***статистически значимые различия между гистологическими формами рака ($p<0,05$)

Таблица 6

Сывороточный уровень суммарной и олигомерной фракций sCD95/sFas при разных гистологических формах опухоли (U/ml)

Фракция sCD95/sFas	Здоровые волонтеры	Опухоль		
		Высоко-дифференцированная	Умеренно-дифференцированная	Низко-дифференцированная
Суммарная	204,2 (128,0; 345,9)	383,9 (305,1; 654,2)*	381,6 (294,6; 525,6)*	390,6 (256,1; 489,1)*
Олигомерная	83,1 (69,3; 129)	275,9 (225,8; 619,2)*	217,7 (186,7; 319,4)*	251,8 (168,2; 291,9)*

*статистически значимые различия по сравнению со здоровыми волонтерами ($p<0,05$)

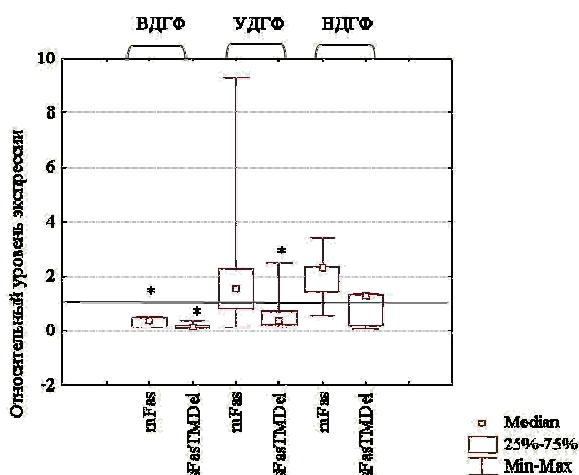
В отношении других минорных форм мРНК CD95/Fas подобные различия отсутствовали. У больных без метастазов частота выявления мРНК FasExo3,4,6Del была статистически значимо выше, чем частота обнаружения мРНК FasExo4,6Del ($p=0,040$). Кроме того, чаще обнаруживалась мРНК FasExo3,4Del, FasExo4,6Del и FasExo3,4,6Del, чем мРНК FasExo4Del ($p<0,001$). При сравнении встречаемости мРНК минорных форм CD95/Fas в крови между группами пациентов с наличием или отсутствием метастазов статистически значимых различий обнаружено не было. По сравнению со здоровыми волонтерами у больных РТК вне зависимости от наличия или отсутствия метастазов мРНК всех минорных форм CD95/Fas выявлялась реже ($p<0,05$).

Выявленные изменения в экспрессии гена CD95/Fas в крови больных РТК сопровождались статистически значимым повышением сывороточного содержания суммарной и олигомерной фракций sCD95/sFas (табл. 4). У больных с метастазами значения данных показателей превышали норму в 1,9 раза и в 2,7 раза, соответственно, а при отсутствии метастазов – в 1,7 раза и в 2,5 раза, соответственно.

Корреляционный анализ не выявил статистически значимой взаимосвязи между уровнем представленности мРНК mFas и мРНК sFasTMDel в крови больных, имеющих и не имеющих метастазы, и сывороточным уровнем суммарной и олигомерной фракций sCD95/sFas.

Экспрессия CD95/Fas в крови больных при разных гистологических формах опухоли

У больных с ВДГФ РТК относительный уровень представленности мРНК mFas и мРНК sFasTMDel был статистически значимо снижен по сравнению со здоровыми волонтерами ($p=0,025$ и $p=0,015$ соответственно; рис. 3). При УДГФ уровень мРНК mFas имел тенденцию к повышению, а уровень мРНК sFasTMDel был статистически значимо снижен ($p=0,014$). При НДГФ РТК статистически значимых различий обнаружено не было.



*статистически значимые различия по сравнению со здоровыми волонтерами ($p<0,05$);

Рис. 3. Уровень мРНК mFas и мРНК sFasTMDel при разных гистологических формах опухоли: уровень мРНК mFas и мРНК sFasTMDel здоровых волонтеров принят за 1.

Коэффициент К превышал норму при всех гистологических формах опухоли ($p<0,001$). При ВДГФ он соответствовал величине, равной $0,31/0,16=1,9$ отн.

ед; при УДГФ он был равен $1,34/0,41=3,3$ отн. ед.; при НДГФ – $1,88/0,59=3,2$ отн. ед. То есть у больных с низкодифференцированной и умереннодифференцированной формами опухоли коэффициент К превышал норму более, чем в три раза.

Встречаемость минорных мРНК CD95/Fas колебалась в широких пределах, однако различия при НДГФ и ВДГФ не были статистически значимы (табл. 5). При УДГФ частота выявления мРНК FasExo3,4Del, FasExo4,6Del и FasExo3,4,6Del была статистически значимо выше, чем частота выявления мРНК FasExo4Del ($p<0,001$, $p=0,009$ и $p<0,001$, соответственно). Частота обнаружения мРНК FasExo3,4,6Del была статистически значимо выше, чем частота выявления мРНК FasExo4,6Del ($p=0,007$).

Межгрупповой анализ встречаемости минорных мРНК CD95/Fas выявил статистически значимые различия в частоте выявления мРНК FasExo3,4,6Del при УДГФ и НДГФ ($p=0,024$). По сравнению со здоровыми волонтерами у больных РТК вне зависимости от гистологической формы опухоли все минорные мРНК выявлялась реже ($p<0,05$). Самой низкой частотой выявления минорных мРНК характеризовалась низкодифференцированная форма.

Сывороточное содержание суммарной и олигомерной фракций sCD95/sFas при всех гистологических формах опухоли статистически значимо превышало норму ($p<0,05$) (табл. 6). При ВДГФ значения данных показателей превышали норму в 1,9 раза и в 3,3 раза, соответственно, при УДГФ – в 1,9 раза и в 2,6 раза, соответственно, а при НДГФ – в 1,9 раза и в 3 раза соответственно.

Корреляционный анализ не выявил статистически значимой взаимосвязи между уровнем представленности мРНК mFas и мРНК sFasTMDel и сывороточным содержанием суммарной и олигомерной фракций sCD95/sFas при разной степени дифференцировки опухоли.

Согласно литературным данным нормальные эпителиальные клетки толстой кишки экспрессируют CD95/Fas [18]. В линиях клеток РТК SW480, SW620 и HT29 детектируется мРНК CD95/Fas и продукт ее трансляции, выявляемый на мембране опухолевых клеток на низком уровне [14; 21]. У больных РТК также наблюдается снижение экспрессии CD95/Fas на мембране опухолевых клеток, что снижает их восприимчивость к индукции апоптоза. Показано, что наиболее выраженное снижение экспрессии CD95/Fas наблюдается на более поздних стадиях РТК [12]. С другой стороны, на мембране лимфоцитов, инфильтрирующих опухолевый очаг, экспрессия CD95/Fas повышается. Следует отметить, что не обнаружено взаимосвязи между экспрессией CD95/Fas в опухолевых клетках и стадией РТК, наличием метастазов, гистологическим типом опухоли [18].

Известно, что в норме активация иммуннокомпетентных клеток сопровождается изменением экспрессии гена CD95/Fas [1; 13]. Это выражается в увеличении количества мРНК mFas и ее белкового продукта, участвующего в инициации Fas-зависимого апоптоза, а также в снижении количества мРНК растворимых форм CD95/Fas, продукты трансляции которых потенциально могут препятствовать передаче апоптотического сигнала. Следовательно, анализ экспрессии гена CD95/Fas может быть использован для оценки функционального состояния клеток иммунной системы.

В настоящей работе нами показано, что уровень мРНК Fas/CD95 в крови больных на всех ста-

диях РТК находился в пределах нормы. Уровень мРНК sFasTMDel имел устойчивую тенденцию к снижению, что отражалось в повышении на всех стадиях заболевания коэффициента К, представляющего собой отношение уровня мРНК mFas к уровню мРНК sFasTMDel. Коэффициент К был повышен как у больных с метастазами так и без них. Отличительной чертой больных РТК без метастазов явилось статистически значимое снижение уровня мРНК sFasTMDel.

Больные с гистологически высокодифференцированной опухолью имели пониженный уровень обоих вариантов мРНК. Обнаружено, что по мере уменьшения степени дифференцировки опухоли уровень мРНК mFas и sFasTMDel нормализовался. В то же время коэффициент К имел тенденцию к увеличению. У больных с низкодифференцированной и умереннодифференцированной формами опухоли коэффициент К был почти в два раза выше, чем у больных с высокодифференцированной гистологической формой опухоли.

Как толстой кишки сопровождался снижением частоты выявления минорных форм мРНК Fas/CD95 в крови вне зависимости от стадии заболевания, наличия метастазов и гистологической формы опухоли. Минорная форма мРНК Fas/CD95 с делецией 4 экзона (FasExo4Del) обнаруживалась реже других минорных форм.

Чаще всего регистрировалось присутствие минорной формы с делециями 3; 4; 6 экзонов (FasExo3,4,6Del). Самой низкой частотой выявления минорных форм характеризовались больные с низкодифференцированной опухолью. Заметим, что у больных с метастазами чаще всего выявлялась всего одна минорная форма в отличие от больных без метастазов, у которых в большинстве случаев детектировалось по три минорных варианта мРНК Fas/CD95. Как больные с низкодифференцированными опухолями, так и больные с метастазами имели самые высокие значения коэффициента К. То есть снижение количества выявляемых минорных форм в целом было ассоциировано с увеличением коэффициента К, отражающего соотношение уровня мРНК mFas и уровня мРНК sFasTMDel. Выявленные особенности, вероятно, связаны с механизмами регуляции работы гена CD95/Fas в крови при раке толстой кишки.

Литература

1. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. М.: «Эдиториал УРСС», 2002. – 320 с.
2. Новиков Д.В., Новиков В.В. Новый метод детекции мРНК мембранной и доминирующей растворимой формы Fas-протеина // Материалы II Московского международного конгресса «Биотехнология: Состояние и перспективы развития», Москва. – 2003. – С. 71–2.
3. Новиков Д.В., Лебедев М.Ю., Уткин О.В. и др. Метод сравнительной оценки экспрессии мРНК мембранной и доминирующей растворимой форм Fas антигена с использованием ПЦР в реальном времени // Материалы III Московского международного конгресса «Биотехнология: Состояние и перспективы развития», Москва. – 2005. – С. 195.
4. Птицына Ю.С., Кравченко Г.А., Новиков В.В. и др. Уровень сывороточного CD95 олигомера у наркоманов, больных хроническим вирусным гепатитом С // Вестн. ННГУ, сер. Биол. – 2004. – Вып. 3. – С. 211–3.
5. Рыжов С.В., Новиков В.В. Молекулярные механизмы апоптотических процессов // Российский биотерапевтический журнал. – 2002. – Т. 1, №3 – С. 27–33.
6. Уткин О.В., Новиков В.В. Регуляция апоптоза с помощью альтернативного сплайсинга матричной РНК // Российский биотерапевтический журнал – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 13–20.
7. Уткин О.В., Лебедев М.Ю., Новиков Д.В. и др. Спектр мРНК Fas-антигена мононуклеарных клеток крови и сывороточное содержание растворимого Fas у тяжелообожженных больных // Иммунол. – 2008. – Т. 29 – С. 362–5.
8. Abbasova S.G., Vysotskii M.M., Ovchinnikova L.K. et al. Cancer and soluble FAS // Bull Exp. Biol. Med. – 2009. – 148(4). – Р. 638–42.

Наряду с мембранным белком продуктом гена CD95/Fas является растворимый белок, образующийся за счет альтернативного сплайсинга мРНК или посттрансляционной модификации мембранного белка путем протеолитического шеддинга. Данные литературы, касающиеся суммарной фракции sCD95/sFas, противоречивы.

С одной стороны, они соответствуют полученным нами результатам о повышении сывороточного содержания sCD95/sFas [8; 11], с другой стороны в одном из исследований описано снижение сывороточного уровня sCD95/sFas у больных раком толстой кишки с метастазами [20].

Повышение сывороточного содержания было зарегистрировано нами не только для суммарной, но и для олигомерной фракции растворимых молекул CD95/Fas. В сравнении с нормой содержание олигомерной фракции повышалось в большей степени, чем суммарной.

Это указывает на смещение равновесия между количественным содержанием олигомерной и мономерной фракций sCD95/sFas в сторону олигомерной фракции, проявляющей проапоптотические свойства в отношении FasL-положительных клеток.

Заключение

Таким образом, при раке толстой кишки в периферической крови больных обнаружены изменения в экспрессии гена Fas/CD95, проявляющиеся в вариации спектров альтернативных форм мРНК, уровней их представленности в клетках и в увеличении сывороточного содержания суммарной и олигомерной фракций растворимого белка Fas/CD95. Повышенное в несколько раз соотношение мРНК мембранной формы и доминирующей растворимой формы указывает на изменение Fas/CD95-ассоциированного активационного статуса клеток периферической крови. По мере увеличения степени агрессивности опухоли такие изменения были более выражены.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг и Российского фонда фундаментальных исследований (проект №11-04-97088p_поволжье_a)

9. Cheng J., Zhou I., Liu C. *et al.* Protection from Fas-mediated apoptosis by soluble form of the Fas molecule // Science. – 1994. – 263. – P. 1759–62.
10. Chomyszynskii P., Sacchi N. Single – step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate – phenol-chloroform extraction // Analytical biochem. – 1987. – 162. – P. 156–9.
11. Kushlinskii N.E., Britvin T.A., Abbasova S.G. *et al.* Soluble Fas antigen in the serum of patients with colon cancer // Bull. Exp. Biol. Med. – 2001. – 131(4). – P. 361–3.
12. Kykalos S., Mathaiou S., Karayiannakis A.J. *et al.* Tissue Expression of the Proteins Fas and Fas Ligand in Colorectal Cancer and Liver Metastases // J. Gastrointest. Cancer. – 2011. – Jan 27. Abstract.
13. Liu C., Cheng J., Mountz J.D. Differential expression of human Fas mRNA species upon peripheral blood mononuclear cell activation // J. Biochem. – 1995. – 310. – P. 957–63.
14. O'Connell J., O'Sullivan G.C., Collins J.K., Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand // J. Exp. Med. – 1996. – 184(3). – P. 1075–82.
15. Papoff G., Cascino I., Eramo A. *et al.* An N-terminal domain shared by Fas/Apo-1 (CD95) soluble variants prevents cell death in vitro // J. Immunol. – 1996. – 156. – P. 4622–30.
16. Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR // Nucl. Acids Res. – 2002. – 30(9). – P. 1–10.
17. Proussakova O.V., Rabaya N.A., Moshnikova A.B. *et al.* Oligomerization of Soluble Fas Antigen Induces Its Cytotoxicity // J. Biol. Chem. – 2003. – 278. – P. 36236–41.
18. Pryczynicz A., Guzińska-Ustymowicz K., Kemona A. Fas/FasL expression in colorectal cancer // An immunohistochemical study Folia Histochemica et Cytobiologica. – 2010. – 48(3). – P. 425–9.
19. Ptitsyna Yu.S., Borneyakova L.A., Baryshnikov A.Yu. *et al.* A soluble form of Fas/Apo-1 (CD95) antigen in the serum of viral hepatitis patients // Int. J. Immunorehab. – 1999. – 4. – P. 110–1.
20. Yildiz R., Benekli M., Buyukberber S. *et al.* The effect of bevacizumab on serum soluble FAS/FASL and TRAIL and its receptors (DR4 and DR5) in metastatic colorectal cancer // J. Cancer Res. Clin. Oncol. – 2010. – 136(10). – P. 1471–6.
21. Zhu Q., Liu J.Y., Yang C.M. *et al.* Influence of antitumor drugs on the expression of Fas system in SW480 colon cancer cells // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. – 2006. – 18(10). – P. 1071–7.

Список сокращений

ВДГФ	–	высокодифференцированная гистологическая форма
НДГФ	–	низкодифференцированная гистологическая форма
РТК	–	рак толстой кишки
УДГФ	–	умереннодифференцированная гистологическая форма

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



Не следует параллельно использовать термин и его сокращение. Если сокращений больше 10, следует вводить список сокращений. В статьях должна использоваться система СИ. В тексте должны быть указаны ссылки на таблицы и рисунки, например, **(табл. 1); (рис. 1)** или **на рис. 1 представлены...** Они должны быть размещены в соответствующих по смыслу абзацах и последовательно пронумерованы. Рисунки и таблицы нумеруются отдельно.

Таблицы должны быть компактными, иметь название, не повторять графики, не должны содержать пустых ячеек (отсутствие данных должно отмечаться тире, «нет данных» или специальным примечанием). Все уточнения и локальные сокращения выносятся в примечания. Таблицы набираются тем же шрифтом, что и основной текст статьи с выравниванием по левому краю, без переносов и красных строк. Точку после последнего слова в ячейке ставить не нужно. Примечания к таблицам выносятся в последней строке таблицы тем же шрифтом. Каждое примечание должно располагаться с новой строки, помечено надстрочной цифрой, которая отделяется от текста примечания пробелом. В конце каждого примечания ставится точка. Примечания нумеруются в соответствии с их появлением в таблице: сверху вниз и слева направо. Размер каждого рисунка (даже если они смаскетированы вместе) должен быть не менее 10 × 15 см. Рентгенограммы должны быть представлены в негативном изображении. Иллюстрации сканируют в масштабе 100 % с разрешением 300 dpi. Рентгенограммы, сонограммы, фотографии сканируют в режиме «Gray».

Если под одной подписью планируется несколько рисунков, каждый должен быть прислан отдельно и соответствовать указаным выше требованиям по качеству.

Графики и схемы нельзя перегружать надписями. Подпись к рисунку должна быть лаконичной, точно соответствовать его содержанию. Если несколько рисунков идут под общей надписью, то сначала приводят ее, а затем названия отдельных рисунков под русскими буквами.

В подписях под рисунками должны быть объяснены все кривые, буквенные, цифровые и другие условные обозначения. В подписях под микрофотографиями следует указать методику микроскопии, увеличение, метод окраски материала. Если иллюстрация заимствуется из другого источника, в конце подписи следует дать на него ссылку. На печатном экземпляре рисунки нумеруют, помечают верх и низ.

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

Список литературы должен быть кратким и содержать не более 20 ссылок для статей, посвященных экспериментальным и клиническим исследованиям, и не более 100 ссылок для обзорных статей. Номера ссылок указывается в квадратных скобках через точку с запятой.

В списке литературы в алфавитном порядке перечисляются курсивом *фамилии и инициалы авторов* на русском языке, затем на иностранных языках.

Все библиографические ссылки в тексте должны быть пронумерованы в соответствии с их положением в списке литературы. Фамилии иностранных авторов приводятся в оригинальной транскрипции. В список литературы не включаются ссылки на неопубликованные работы и учебники. Ссылки должны быть тщательно выверены авторами, которые несут ответственность за правильность приведенных данных.

Если авторов не более четырех, они упоминаются все, при большем числе авторов перечисляются первые три, далее пишется *и др.* или *et. al.*

При ссылке на книгу следует указывать авторов, затем название книги, номер издания, издательство (может отсутствовать), год и страницы (если автор ссылается на всю книгу, то пишется 150 с., если на ее часть, то указывается С. 143-8.), например:

Руководство по гематологии под ред. А.И. Воробьева. – Т. 2. – М.: Ньюдиамед, 2004. – 277 с.
Bihrl R., Libertino J.A. Renal cell cancer with extension into the vena cava. In: Dekernion B.J., Pavone-Macaluso M. eds., Tumors of kidney. – Baltimore: Williams&Wilkins, 1986. – P. 111–123.

УДК 616-006.448-085.277.3:611.018.54:615.373

Т.А. Митина¹, А.К. Голенков¹, А.Ю. Барышников², А.В. Караулов³, Е.В. Трифонова¹,
Ю.Б. Черных¹, Е.В. Катаева¹, Т.Д. Луцкая¹, Л.Л. Высоцкая¹, Г.А. Дудина¹, С.Г. Захаров¹,
А.М. Фомин¹, Н.В. Любимова², И.Н. Когарко⁴, Б.С. Когарко⁴

**КИНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСТАТОЧНОЙ ОПУХОЛИ
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ
НА ОСНОВАНИИ АНАЛИЗА СВОБОДНЫХ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ**

¹ГБУЗ Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского

²ФБГУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

⁴Научно-исследовательский институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва

Контактная информация

Митина Татьяна Алексеевна, к.м.н., с.н.с. отделения клинической гематологии и иммунотерапии

адрес: 117218, Москва, ул. Б. Черемушkinsкая д.20, к.4, кв.301; тел. +7(905)-706-4068

e-mail: mi_69@inbox.ru

Статья поступила: 22.01.2013, принята к печати 01.02.2013.

Резюме

Цель исследования – определить эффективность бортезомибсодержащей химиотерапии множественной миеломы, включая случаи с ХПН на основании определения концентрации свободных легких цепей иммуноглобулинов сыворотки крови.

У 11 больных ММ изучены кинетические параметры остаточной опухоли в межкурсовых интервалах поддерживающего лечения на основании анализа СЛЦ иммуноглобулинов сыворотки. СЛЦ к и λ определяли с помощью антител к их скрытым детерминантам (Binding Site, UK) на нефелометре (Hitachi-911, Japan).

В первой группе (5 больных) заболевание протекало с сохраненной функцией почек. Концентрацию СЛЦ и отношение к / λ определяли с трехмесячными интервалами в течение 9 мес. Анализ показал, что у 2 из 5 больных по первому контролю отношение исследованных концентраций СЛЦ опухолевого клона к исходным было меньше 1, а к / λ отношение значительно уменьшалось в конечной точке анализа, хотя и носило опухолевый характер. У двух больных отмечено медленное прогрессирование по кинетическим параметрам двух точек исследования и выраженное в конечной точке анализа. Эти данные послужили основанием для изменения терапии. У одной пациентки отмечено кинетическое плато по двум точкам анализа в течение 6 мес. и активация опухолевого роста к 9 месяцам наблюдения. Сохраняющееся отношение к / λ в нормальных значениях и небольшой сдвиг его в зону активации опухолевого роста к 9 месяцу свидетельствовал о сочетании прогрессии ММ и ХПН. Во второй группе (6 пациентов) заболевание сопровождалось развитием ХПН, что потребовало применения гемодиализа у 5 и перитонеального диализа у 1 больного. Эффективность проводимой противоопухолевой терапии оценивали практически в реальном времени после 1 или 2 курсов, учитывая короткий период полураспада СЛЦ. У всех больных отношение исследованных концентраций СЛЦ опухолевого клона к исходным было меньше 1, что свидетельствовало об эффективности лечения. Отношение к / λ, также свидетельствовало о положительных кинетических характеристиках опухоли у наблюдаемых больных. Исследование показало, что ухудшение функции почек под влиянием ХТ не происходило. У одной больной показана эффективность обменного плазмафереза, позволившего снизить концентрацию СЛЦ опухолевого клона на 62% после 5 сеансов лечения.

Проведенное исследование показало высокую эффективность применения бортезомибсодержащей терапии при различных вариантах течения множественной миеломы на основе анализа свободных легких цепей иммуноглобулинов сыворотки. Метод определения СЛЦ иммуноглобулинов сыворотки крови дает возможность оценить изменение кинетических параметров остаточной опухоли раньше стандартных методов, определить прогноз течения болезни и выбрать оптимальный подход к лечению заболевания.

Ключевые слова: множественная миелома, свободные легкие цепи, бортезомиб.

Т.А. Mitina¹, А.К. Golenkov¹, А.Ю. Baryshnikov², А.В. Karaulov³, Е.В. Trifonova¹,
Yu.B. Chernykh¹, Е.В. Kataeva¹, Т.Д. Lutskaia¹, L.L. Vysotskaya¹, G.A. Dudina¹, S.G. Zakharov¹,
А.М. Fomin¹, N.V. Lubimova², I.N. Kogarko⁴, B.S. Kogarko⁴

**KINETIC PROPERTIES OF RESIDUAL TUMOR
IN DIFFERENT TYPES OF MULTIPLE MYELOMA BASED
ON SERUM IMMUNOGLOBULIN
FREE LIGHT CHAINS ANALYSIS**

¹Governmental budget sponsored healthcare institution Moscow region research institute named after M.F. Vladimirovskiy

²FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow

³I.M. Sechenov First Moscow governmental medical university

⁴N.N. Semenov Governmental research institution of chemical physics of RAS, Moscow

Abstract

Header: kinetics of free light immunoglobulin chains of tumor clone during bortezomib based chemotherapy

Objective: evaluation of bortezomib based chemotherapy of multiple myeloma efficacy, including the cases of chronic renal failure, based on determination of free light immunoglobulin chains serum level.

Kinetic properties of residual tumors were evaluated in 11 patients with MM during the intervals between the maintenance treatment courses. Evaluation was based on the analysis of immunoglobulin free light chains serum levels. Free light chains κ and λ type levels were evaluated using antibodies to their hidden determinants (Binding Site, UK) and the nephelometer (Hitachi-911, Japan).

Patients with preserved renal function were included into the first group (5 patients). The concentration of free light immunoglobulin chains and the κ / λ ratio was evaluated at 3-months intervals during 9 months. It was demonstrated that in 2 of 5 patients the ratio of tumor clone free light chains level to basic level at the first time point was <1 , with significant decrease of κ / λ ratio by the final time point; however, the tumor pattern of ratio persisted. In 2 patients slow progression of kinetic parameters was demonstrated at 2 time points, with significant progression at final time point was demonstrated. These changes were considered indication to treatment change. The plateau level of kinetic parameters at 2 time points (6 months) was demonstrated in 1 female patient; tumor growth progression was demonstrated by 9-th month of follow up. Normal κ / λ ratio with a mild shift to tumor growth activation by 9-th month was indicative of MM and chronic renal failure progression. Patients with chronic renal failure were included into the second group (6 patients). 5 patients were receiving hemodialysis; 1 patient was receiving peritoneal dialysis. Anti-tumor treatment efficacy was evaluated in a real-time mode after 1 or 2 treatment courses, considering the short half-life period of free light immunoglobulin chains. The ratio of immunoglobulin free light changes detected serum levels to basic values were <1 in all patients, thus demonstration treatment efficacy. The κ / λ ratio demonstrated positive kinetic properties of tumor in patients. The study demonstrated that chemotherapy is not associated with renal dysfunction progression. In one patient the efficacy of replacing plasmapheresis was demonstrated – the immunoglobulin free light changes of the tumor clone level decreased by 62% after 5 treatment courses.

Conclusion: the study demonstrated high efficacy of bortezomib based treatment in different types of multiple myeloma based of immunoglobulin free light chains serum level changes. Assessment of immunoglobulin free light chains serum level enables the early evaluation of residual tumor kinetic parameters compared to standard methods. This method enables prediction of disease outcomes and choice of optimum treatment.

Key words: multiple myeloma, free light chains, bortezomib.

Введение

Внедрение в широкую клиническую практику метода анализа свободных легких цепей иммуноглобулинов сыворотки (СЛЦ Ig) при MM обусловлено их биологическими особенностями и возможностью определения на автоматических анализаторах. В контексте клинического применения анализа СЛЦ следует отметить ряд их особенностей. Прежде всего, это короткое время полураспада, точность определения за счет специфичности диагностических антител против их скрытых детерминант, стабильная воспроизводимость определения их концентраций в сыворотке, связь с фильтрационно-реабсорбционной функцией почек. Способность λ СЛЦ образовывать димеры уменьшает их клиренс в почках, увеличивая концентрацию в крови, что отличает нормальное κ / λ отношение СЛЦ от общих [8]. Синтез СЛЦ при MM с интактной молекулой pIg (IpIg) [2; 7; 9] послужил основанием для использования этого метода диагностики строго полного ответа при лечении MM независимо от иммунохимического варианта болезни и для диагностики доклинического рецидива [7]. Большое клиническое значение имеет применение метода анализа СЛЦ при BJ MM, когда почки еще могут реабсорбировать избыток опухолевого BJ-белка и нет протеинурии перегрузки. Это очень важное положение для клинической практики, в связи с нефротоксичностью СЛЦ. По существу, в этот период течения MM можно оценить предпочтительную перегрузку и начать противоопухолевое лечение для снижения продукции опухолевых СЛЦ и уменьшить риск поражения почек. Короткий период полураспада СЛЦ позволяет оценить ответ на лечение в реальном времени и применить более эффективную терапию при диагностировании резистентности. Этот же метод стал применяться для фармакодинамического анализа комбинаций противоопухолевых препаратов для последующего клинического анализа их эффективности [3]. Учитывая изложенное, предпринято настоящее исследование, направленное на изучение клинического значения анализа СЛЦ при различных вариантах течения MM.

Материалы и методы

В исследование включены 11 больных с MM, которые подписали информированное согласие, среди них секрета интактной молекулы pIg (IpIg) установлена у 3, изолированная BJ у 3, смешанная (BJ+pIg) у 5. Больные были разделены на две группы в зависимости от наличия ($n=6$) или отсутствия ($n=5$) ХПН. Всем больным проводили стандартные гематологические и иммунохимические исследования. Концентрацию СЛЦ определяли в сыворотке крови с помощью антител к их скрытым детерминантам (Binding Site, UK) на нефелометре (Hitachi-911, Japan).

Взятие образцов крови осуществляли сразу после курса лечения или 3-кратно в течение поддерживающего лечения. Образцы замораживали при -40°C и хранили до проведения исследования.

Результаты

В табл. 1 представлены результаты исследований больных MM, прошедших фазу индукционного ХТ-лечения и достигших плато на различных объемах остаточной опухоли. Всем больным была назначена поддерживающая ХТ. Кинетическая характеристика остаточной опухоли осуществлялась на основании определения концентрации СЛЦ в течение 9 мес. каждые 3 мес. Использовали отношение концентраций СЛЦ опухолевого клона в каждом временном интервале к исходному значению. Важной характеристикой персистирующего опухолевого клона и функции почек являются показатели κ / λ отношения концентраций СЛЦ, которое определяли в качестве исходных значений и в конечной точке исследования.

В клиническом примере MM1-1 представлены результаты лечения больной с MM 3 ст. IgG λ +BJ λ , у которой было достигнуто плато опухоли и удерживалось с помощью поддерживающей ХТ (курс VM). Через 3 мес. отмечено нарастание концентрации опухолевых СЛЦ (oСЛЦ) λ -типа в 2,4 раза, через 6 мес. дальнейшего роста не было (2,3 раза) и через 9 мес. их концентрация повысилась в 3,4 раза от исходных значений.

Таблица 1

Фармакокинетика остаточной опухоли при ММ на основании анализа свободных легких цепей иммуноглобулинов сыворотки крови в течение 9 мес. лечения

	Диагноз	Срок болезни до исследования, мес	Кинетическая фаза болезни до исследования	Отношение концентраций оСЛЦ от исходных в интервалах, мес			Динамика к/л отношения	ХТ
				3	6	9		
ММ1-1	ММ 3ст Gλ+BJλ	90	плато	2,4	2,3	3,4	0,27→0,25	VM
ММ1-2	ММ 3ст Gκ	48	плато	0,92	—	—	33,6→26,4	VMP
ММ1-3	ММ 3ст Gκ+BJκ	30	плато	0,98	—	—	8,5→8,2	VM
ММ1-4	ММ 3ст Gκ	24	плато	2,1	2,6	3,0	29,8→92,4	VT → RVP
ММ1-5	ММ 3ст Gκ	48	плато	1,3	1,8	17,8	0,55→3,6	VMP

Анализ к/л отношения показал, что оно не изменялось в течение всего периода наблюдения и оставалось в пределах нормальных значений. Неселективное нарастание оСЛЦ в этом случае без изменения к/л отношения в динамике свидетельствовало о формировании ХПН за 5 мес. до клинических проявлений и стандартных лабораторных показателей азотемии (креатинин сыворотки крови увеличился с 97 до 700 мкмоль/л).

Во втором и третьем наблюдениях ММ1-2 и ММ1-3 (ММ3ст. pIgGκ и ММ3ст. pIgGκ+BJκ) проводили поддерживающее лечение курсами VMP с интервалами по 3 мес., что сохраняло плато на достаточно высоком объеме остаточной опухоли. В четвертом и пятом наблюдениях ММ1-4 и ММ1-5 (у обеих больных вариант ММ 3 ст. pIgGκ) плато поддерживали курсами VT и VMP соответственно. После 3 мес. отмечено нарастание концентрации оСЛЦ в обоих наблюдениях (в 2,1 и 1,3 раза соответственно). К 9 мес. наблюдения в обоих случаях зафиксировано прогрессирование заболевания как по избирательному нарастанию оСЛЦ, так и по к/л отношению с 29,8 до 92,4 в одном наблюдении и с 0,55 до 3,6 в другом. Следует отметить, что в случае ММ1-4, за период исследования отмечено увеличение опухолевого парапротеина в 1,03 раза, за это же время увеличение концентрации оСЛЦ было более чем в 3 раза. Таким образом, данные наблюдения показали, что с помощью метода определения СЛЦ иммуноглобулинов сыворотки можно получить важную для клиники информацию о кинетике опухолевого роста при ММ. В двух представленных наблюдениях была зафиксирована стабилизация кинетического плато на разных объемах опухоли, что свидетельствует о хорошем терапевтическом эффекте VMP-программы, применявшейся в режиме поддерживающего лечения. Это позволило предотвратить прогрессирование резистентной ММ. В двух других наблюдениях зафиксировано прогрессирование болезни, что послужило основанием для изменения программы лечения.

Из данных табл. 2 видно, что у всех обследуемых пациентов заболевание протекало с выраженной миеломной нефропатией. У 3 из 6 больных диагностирована изолированная BJκ-протеинурия, у остальных отмечено сочетание BJκ+pIgGκ (n=2) и BJλ+pIgDλ. У всех больных степень нефропатии была тяжелой, что потребовало проведения гемодиализа у 5 лиц, а в одном наблюдении был применен перитонеальный диализ. В первом наблюдении ММ2-1 (ММ 3Вст. BJκ) 11-дневные курсы VMP

проводили в сочетании с перитонеальным диализом. Анализ кинетики СЛЦ иммуноглобулинов сыворотки показал снижение концентрации опухолевой к СЛЦ на 78 % сразу после завершения курса. Этот показатель означает эффективную противоопухолевую фармакодинамику программы VMP, определенную практически в реальном времени. Важным показателем является кинетика неопухолевой λ СЛЦ, указывающий на ее снижение на 73% при исходном повышении. Опираясь на наши предыдущие исследования [3], можно говорить о высокой противоопухолевой избирательности велкейсодержащих программ. В таком случае, снижение концентрации λ СЛЦ в данном наблюдении может указывать на тенденцию к восстановлению функции почек по возросшему клиренсу λ СЛЦ. У второй больной ММ2-2 (ММ3В ст. BJκ+pIgGκ) заболевание дебютировало с ОПН, что потребовало проведения гемодиализа. В дальнейшем сохранялась компенсированная ХПН без ГД. Лечение по протоколу VMP позволило получить полную ремиссию, подтвержденную иммунохимическими исследованиями с отрицательной иммунофиксацией, что сопровождалось нормальной концентрацией СЛЦ. Проведенное исследование позволило подтвердить кинетическое плато остаточной опухоли на уровне минимального объема. В наблюдении ММ2-3 (ММ 3В ст. IgDλ+BJλ) по анализу кинетики СЛЦ видна эффективность программы PAD. В результате проведенного курса лечения концентрация оСЛЦ-λ снизилась на 17 %. При этом концентрация неопухолевой κ-СЛЦ увеличилась в 2 раза, что, вероятно, связано с нарушенным их клиренсом в почках под влиянием токсического действия цитостатиков. В наблюдении ММ2-4 (ММ3В ст. BJκ+pIgGκ) заболевание проявилось с ОПН, которая была купирована ГД. Анализ 2 курсов лечения велкейдом показал селективное снижение концентрации оСЛЦ-κ в сыворотке на 37 %. При этом, к/л отношение имело существенную тенденцию к нормализации (с 11,2 до 7,0). Концентрация неопухолевых СЛЦ-λ находилась в пределах нормальных значений, что указывало на сохраненную функцию почек. В дальнейшем после 3 курсов лечения велкейдом у больного был получен очень хороший частичный ответ [7].

В наблюдении ММ2-5 (ММ 3Вст. BJκ, ХПН 4 ст.) в дебюте заболевания диагностирована терминальная стадия ХПН, требовавшая заместительной почечной терапии. В результате противоопухолевого лечения и ГД функция почек была частично восстановлена и стабилизирована.

Таблица 2

Кинетическая характеристика остаточной опухоли у больных ММ, осложненной ХПН на основании анализа СЛЦ в процессе лечения

Диагноз	Осложнение	Диализ		Количество курсов		Отношение концентрации оСЛЦ к исходной	к/λ **		Длительность Наблюдения, мес
		тип	продолжение	всего	оценено		до	после	
ММ2-1 мм 3 ст ВЖк	ХПН	ПД	+	4 VMP	1 VMP	0,22	2,35	1,9	6→
мм2-2 мм 3 ст Гк+ВЖк	ОПН, ХПН	ГД	–	8 VMP	1 VMP	0,95	1,2	1,2	70→
мм2-3 мм 3 ст Dλ+ВЖλ	ХПН	ГД	+	2 PAD	2 PAD	1,06 → 0,83	0,08	0,23	2→
мм2-4 мм 3 ст Гк+ВЖк	ОПН	ГД	–	8 V	2 V	0,67→0,63	11,2	7,0	2→
мм2-5 мм 3 ст ВЖк	ХПН	ГД	++	8 VMP →V	2V	0,55→0,65	13,7	5,5	60↓
мм2-6 мм 3 ст ВЖк	ХПН	ГД	+	4 VMP V ОБПФ	ОП + 2 VMP	0,38 0,18	7,8	1,7	6→

*возобновление ГД после перерыва;

** N к/λ-отношения 0,6 (0,31–1,2)

ГД был прекращен на 1,5 года, однако, впоследствии возобновлен. Анализ концентрации СЛЦ в процессе монотерапии велкейдом показал селективное снижение оСЛЦ-к после курса на 45 %. При этом концентрация неопухолевых СЛЦ-λ была на уровне средних значений нормы. Учитывая тяжелую степень ХПН с уровнем клубочковой фильтрации от 2 до 4 мл/мин, массивную суточную протеинурию до 5 г нормальную концентрацию неопухолевых антителпродуцентов следует рассматривать как ложноположительную, связанную с накоплением λ-СЛЦ в сыворотке за счет нарушенного их метаболизма в почках, скрывающую иммунодефицит.

В наблюдении ММ2-6 (ММ3В ст. ВЖк) заболевание проявилось с тяжелой ХПН, потребовавшей постоянного ГД. Был также применен плазмообмен (5 процедур за 12 дней). За каждую процедуру удаляли около 1 объема циркулирующей плазмы с соответствующим замещением донорской. В дальнейшем проводили противоопухолевую терапию (монотерапия велкейдом и курсы VMP) в сочетании с гемодиализом. В результате ПО концентрации оСЛЦ-к была снижена на 62 %, а после одного курса VMP, проведенного сразу после ОП концентрация оСЛЦ-к была снижена еще на 20 %. Следует отметить, что значение неопухолевых СЛЦ-λ были несколько выше верхней границы нормы. Это свидетельствовало о сохраняющемся нарушении метаболизма СЛЦ в почках, связанных с их поражением, а снижение уровня оСЛЦ-к под влиянием лечения может уменьшать риск их дальнейшего повреждения.

Обсуждение

Проведенное исследование позволяет оценить клиническое значение анализа СЛЦ иммуноглобулинов сыворотки у больных ММ в процессе лечения. Изучено две группы больных ММ:

- 1 – с сохраненной функцией почек (n=5),
- 2 – с миеломной нефропатией (n=6).

Больные 1 группы находились в программах индукционного и поддерживающего ХТ лечения. Больным 2 группы наряду с противоопухолевой ХТ проводили ГД и ОП. Важно отметить, что у больных 1 группы ММ с IgG диагностирована у 3 из 5. В этой группе не было изолированной ВЖ ММ. Во второй группе у 3 больных установлена изолированная ВЖ ММ, у остальных 3 смешанная форма. Это подтверждает данные о том, что ВЖ протеинурия является фактором повышенного риска поражения почек при ММ [6]. Анализируя результаты исследования СЛЦ больных 1 группы, следует отметить их большое значение для понимания кинетической характеристики остаточной опухоли в течение 9 месяцев по 3-месячным интервалам. Все больные 1 группы имели длительные периоды предлеченности (от 24 до 90 мес.) и их состояние на момент исследования расценивали как кинетическое плато на различных объемах остаточной опухоли. Всем пациентам проводили поддерживающую ХТ 1 раз в 3 мес. Оценивая кинетическую активность остаточной опухоли, можно сказать, что кинетическое плато зафиксировано у 2 больных по 3-месячному интервалу оценки. В этих наблюдениях отношения концентраций оСЛЦ по первому кинетическому контролю к исходным не превышают 1,0. Исследование величины опухолевого клона в конечной точке анализа по к/λ отношению свидетельствовало о его уменьшении. Эти наблюдения указывают на эффективность поддерживающей терапии VMP. В 2 других наблюдениях больных 1 группы можно говорить о кинетической нестабильности плато остаточной опухоли. Уже по первому кинетическому контролю было отмечено нарастание концентраций оСЛЦ и увеличение их отношения к исходным значениям. В конечной точке отсчета эти значения еще больше увеличивались. Это подтверждалось также анализом к/λ-отношения в конечной точке исследования, свидетельствующем об увеличении объема опухолевого клона. Полученные результаты послужили основанием для пе-

ревода одного больного в программу VMP-индукции, в другом наблюдении была применен протокол RVP.

Значительные трудности для анализа результатов представляет наблюдение MM1-1 (MM 3ст. G_λ + BJ_λ). Исходные концентрации κ и λ СЛЦ, а также κ/λ-отношение свидетельствовали о гематологической ремиссии. Дальнейшее наблюдение показало нарастание СЛЦ опухолевого клона (λ) в конечной точке исследования наряду с повышением значений неопухолевой СЛЦ.

Следовательно, в данном наблюдении, наряду с начинающейся прогрессией болезни диагностирована доклиническая ХПН, ранним признаком которой явилось нарушение клиренса СЛЦ в почках и неселективное их накопление в крови с небольшим сдвигом κ/λ-отношения в зону активации опухолевого роста.

Таким образом, оценивая кинетическую характеристику остаточной опухоли у 5 больных MM1 группы, на основании анализа СЛЦ сывороточных Ig в течение 9 месяцев наблюдения, следует отметить высокую клиническую значимость этого метода (обладающего большей чувствительностью, чем стандартные иммунохимические исследования). Прежде всего, удалось подтвердить состояние кинетического плато у больных MM с IgG. У больных со смешанным типом pIg кинетическая стабильность остаточной опухоли должна быть определена не только по динамике интактного pIg, но также по BJpIg.

В данном наблюдении у двух подобных больных зафиксирована минимальная прогрессия по 3-месячной точке контроля, которая нарастала в последующем, что потребовало в дальнейшем изменения программ лечения. Полученные результаты показали, что важно обращать внимание при анализе СЛЦ на селективный характер их повышения, при котором можно идентифицировать активацию кинетики остаточной опухоли. При неселективном нарастании СЛЦ можно думать о развитии ХПН, как правило, связанной с прогрессией заболевания. Эмпирически взятые точки отсчета в нашем исследовании, по которым оценивали кинетику опухоли на основании анализа СЛЦ, позволили выделить клинически важный 3-месячный период. За этот срок среди исследованных больных было диагностировано 2 начинающихся прогрессии заболевания, 1 случай начала прогрессии и начала ХПН, в двух случаях – стабильная кинетика остаточной опухоли.

У 6 больных 2 группы с MM, осложненной нефропатией, мониторинг кинетики остаточной

опухоли проводили с учетом влияния ХПН на клиренс СЛЦ Ig сыворотки. В момент исследования всем больным проводилась индукционная или поддерживающая ХТ, 3 из 6 ГД, а в одном случае ПД. 2 пациентам ГД проводили в начале заболевания в связи с ОПН, которая была купирована. Оценивая результаты противоопухолевого лечения в сочетании с ГД можно отметить противоопухолевый ответ у всех больных, зафиксированный после одного или 2 курсов ХТ. В одном наблюдении кинетика оСЛЦ после курса VMP по существу отражала противоопухолевую фармакодинамику в реальном времени и высокую чувствительность опухоли к данному виду терапии [1].

Важно подчеркнуть, что при этом снижалась или оставалась нормальной концентрация неопухолевой СЛЦ, что могло быть расценено как фактор благоприятного прогноза в улучшении функции почек. В действительности, снижение концентрации оСЛЦ и уменьшение их пассажа через почки предотвращает дальнейшее развитие феномена cast-нефропатии [4; 5].

В то же время, снижение оСЛЦ под влиянием ХТ и повышение концентрации неопухолевой (поликлональной) СЛЦ может говорить о повреждении почек цитостатиками и нарушении их клиренса. Важно так же подчеркнуть возможность подтверждения строгого полного ответа по концентрации СЛЦ и по κ/λ-отношению у больных с отрицательной иммунофиксацией и компенсированной ХПН.

Анализ полученных данных дает основание считать клинически оправданным применение экстракорпоральных методов удаления из циркуляции, повреждающих почки СЛЦ опухолевого клона. Применение в нашем исследовании ОП у больной с ХПН, находящейся на программном ГД, позволило существенно снизить концентрацию оСЛЦ, а последующая VMP-терапия еще больше уменьшила их концентрацию. При этом метаболизм неопухолевой СЛЦ улучшался до значений верхней границы нормы, что могло прогнозировать в дальнейшем стабилизацию функции почек.

Заключение

Таким образом, наше исследование показало, что клинический анализ концентрации СЛЦ Ig сыворотки может в реальном времени дать фармакодинамическую характеристику ХТ лечения, определять прогрессию/рецидив раньше стандартной диагностики, определять влияние ХТ и экстракорпоральной элиминации СЛЦ на функцию почек.

Литература

1. Барышников А.Ю., Иншаков А.Н., Трифонова Е.В. и др. Фармакодинамическое моделирование *in vitro* клинической эффективности флударабина при резистентных формах хронического лимфолейкоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, №4. – С. 25–28.
2. Голенков А.К., Митина Т.А., Луцкая Т.Д. и др. Клиническое значение анализа свободных легких цепей иммуноглобулинов сыворотки при множественной миеломе с различным ответом на химиотерапию // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 3. – С. 71–5.
3. Голенков А.К., Митина Т.А., Когарко И.Н. и др. Фармакодинамическая характеристика эффективности велкейда при резистентной и рецидивной множественной миеломе на основе анализа свободных легких цепей иммуноглобулинов сыворотки крови // Терапевтический архив. – 2009. – Т. 81, № 7. – С. 37–41.
4. Митина Т.А., Голенков А.К., Луцкая Т.Д. и др. Эффективность лечения больных множественной миеломой, осложненной почечной недостаточностью, бортезомибсодержащими программами в сочетании с гемодиализом // Гематология и трансфузиология. – 2011. – Т. 56, № 4. – С. 12–6.
5. Bradwell A.R., Evans N.D., Chappell M.J. et al. Rapid removal of free light chain from serum by hemodialysis for patients with myeloma kidney // Blood. – 2005. – 106 (11). – 3482: 972a

6. Bradwell A.R., Carr-Smith H.D., Mead T.P. et al. Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma // Lancet. – 2003. – 361. – P. 489–91.
7. Durie B.G.M. The importance of the new international uniform response criteria for multiple myeloma // Am.J. Hematol. Oncol. – 2007. – 6(5). – P. 15–8.
8. Katzmann J.A., Clarke R.J., Abraham R.S. et al. Serum Referens intervals and diagnostic ranges for free κ and free λ immunoglobulin light . Relative sensitivity for detection of monoclonal light chains // Clin. Chem. – 2002. – 48. – P. 1437–44.
9. Mead T.P., Carr-Smith H.D., Drayson M.T. et al. Strum free light chains for monitoring multiple myeloma // Br. J. Haematology. – 2004. – 126. – P. 348–54.

Список сокращений

ГД	–	гемодиализ
ПД	–	перитонеальный диализ
ОП	–	обменный плазмаферез
оСЛЦ	–	СЛЦ опухолевого клона
СЛЦ	–	свободные легкие цепи
ММ	–	множественная миелома (multiple myeloma)
ХТ	–	химиотерапия
RVP	–	ревлимид, велкейд, преднизолон
VM	–	велкейд, мелфалан
VMP	–	велкейд, мелфалан, преднизолон
VT	–	велкейд, талидомид

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 618.146-006.6-097:615.37

Д.К. Кенбаева¹, А.Ф. Лазарев²**ЧИСЛЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА
У БОЛЬНЫХ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ В ХОДЕ ИММУНОТЕРАПИИ**¹Городской онкологический диспансер, Астана²Алтайский краевой онкологический диспансер, Барнаул**Контактная информация:**

Кенбаева Динара Кумаровна, канд. мед. наук, заведующая отделением гинекологии

Адрес: Республика Казахстан, г. Астана, пр-т Шакарима Кудайбердиева, д.24/1, кв. 116; тел. 8(701)543-0599

e-mail: dikenb@mail.ru

Статья поступила: 31.08.2012, принята в печать: 15.11.2012.

Резюме

Цель исследования – оценка иммунологической эффективности способа специфической иммунотерапии больных раком шейки матки в сочетании с лучевой терапией. Обследована 81 больная раком шейки матки IIВ и III клинической стадий, подвергавшихся сочетанной лучевой терапии. В группе из 40 человек дополнительно проведена иммунотерапия, заключающаяся в реинфузии индуцированных опухолевым антигеном и препаратом ИЛ-2 лимфоцитов.

При проведении иммунотерапии была выявлена динамика к нормализации исследованных показателей иммунной системы. Однако сохранялись статистически значимые различия с контрольной группой по ряду ключевых исследованных параметров. Специфическая клеточная иммунотерапия, на наш взгляд, не обеспечивает адекватного роста численных показателей противоопухолевого клеточного иммунитета, что может быть одной из причин неблагоприятных отдаленных исходов лечения.

Ключевые слова: рак шейки матки; клеточный иммунитет; специфическая клеточная иммунотерапия.

D.K. Kenbaeva, A.F. Lazarev

**NUMERICAL INDICATORS OF CELLULAR IMMUNITY DURING AN IMMUNOTHERAPY
OF PATIENTS WITH CERVICAL CANCER**¹City Oncology Center, Astana²Altay Regional Oncology Center, Barnaul**Resume**

Research objective: An assessment of immunological efficiency of a method of specific immunotherapy in patients with cervical cancer in a combination to radiation therapy.

It is surveyed 81 patients with cervical cancer of IIВ and the III clinical stages which were exposed to combined radiotherapy. In group of 40 people in addition the immunotherapy is carried out consisting in a reinfuziya of lymphocytes induced by tumoral anti-gene and a preparation interleukin-2.

At carrying out an immunotherapy dynamics to normalization of the investigated indicators of immune system was revealed. Significant distinctions with control group on a number of the main parameters however remained. The specific cellular immunotherapy, in our opinion, doesn't provide adequate growth of numerical indicators of antineoplastic cellular immunity that can be corrected by application of methods of an adoptive immunotherapy.

Key words: cervical cancer; cell immunity; specific cell immune therapy.**Введение**

Иммунотерапию злокачественных новообразований трудно назвать новым методом в онкологии, поскольку история ее развития насчитывает уже более 50 лет [11]. В современных условиях более 15 % исследований в области лечения злокачественных новообразований базируются на подходах, связанных с иммунотерапией, и до 30 % прикладных исследований в области иммунотерапии ассоциированы с лечением новообразований [2; 4; 5].

Важнейшими достижениями в области иммунотерапии злокачественных новообразований являются развитие способов лечения широко распространенных новообразований – меланомы, рака почек, рака легких [6; 10]. В то же время остается широкий спектр злокачественных опухолей, иммунотерапия которых в достаточной степени не разработана. Хотя ключевой причиной является малая иммуногенность многих новообразований [6], кро-

ме этого применению методов иммунотерапии может препятствовать снижение морфофункциональных показателей защитных систем организма, связанное с наличием опухолевого процесса и применением способов специфической иммунотерапии [10]. Преодоление обоих этих ограничений – кардинальное направление развития иммунотерапии злокачественных опухолей [3].

РШМ является одним из распространенных онкологических заболеваний у женщин [9]. Результаты его лечения до настоящего времени оставляют желать лучшего. Достаточно высока частота запущенных форм данной патологии, основным методом лечения которых является сочетанная лучевая терапия. Подходы к иммунотерапии РШМ в достаточной мере не разработаны, что послужило основанием инициации настоящего исследования.

Цель исследования – оценка иммунологической эффективности специфической иммунотерапии в сочетании с лучевой терапией больных раком шейки матки.

Материалы и методы

Осуществлено комплексное клинико-иммунологическое обследование 81 больной РШМ, в том числе 41 – с ПВ и 40 – с III клинической стадией (далее – ст.), в возрасте от 39 до 65 лет, средний возраст по группе ПВ – $49,2 \pm 1,4$ года, по группе III ст. – $50,5 \pm 1,6$ года.

Комплексное лечение больных состояло из применения СЛТ и сочетанной лучевой терапии в комбинации со специфической иммунотерапией (СЛТ + СИТ). Специфическая иммунотерапия проводилась по разработанной методике, основанной на реинфузии аутогенных лимфоцитов, инкубированных с гомогенатом опухолевой ткани и ИЛ-2.

СЛТ проводилась 21 больной РШМ ПВ стадии и у 20 больных РШМ III стадии. СЛТ + СИТ проводилась 20 больным РШМ ПВ стадии и 20 больным РШМ III стадии.

Контрольную группу составили 45 практически здоровых женщин, репрезентативных обеим группам больных по возрасту.

Показатели клеточного иммунитета определялись в динамике комплексного лечения. Осуществлено иммунофенотипирование следующих форм иммуноцитов: $CD3^+$ – зрелые Т-лимфоциты (диагностикум Beckman Coulter, №A07746); $CD3^+CD4^+$ – Т-хелперы (№A07750); $CD3^+CD8^+$ – Т-супрессоры и киллеры (№A07757); $CD3-CD56^+CD16^+$ – натуральные киллеры (№A07735); $CD3^+CD56^+CD16^+$ – Т-киллеры (№A07415); $CD19^+$ – В-лимфоциты (№6603859); $CD4^+CD25^+$ – «юные» $CD4^+$ клетки (№IM3486U); $CD95^+$ – преапоптотические лейкоциты всех кластеров дифференцировки (№IM1504).

Статистическая обработка. При анализе клинических данных использованы параметрические и непараметрические методы. Параметрические методы включали сравнение количественных признаков с помощью критерия Стьюдента, для непрерывных переменных – парного критерия Стьюдента. Ограничения использования параметрических методов включали анализ распределения по критерию Колмогорова-Смирнова, а также критерий равенства дисперсий [1]. При несоблюдении граничных критериев применимости параметрических методов использованы непараметрические методы анализа – в независимых выборках – по критерию Манна – Уитни, в динамике наблюдения – по критерию Вилкоксона. В ходе анализа наличие возможности применения параметрического критерия статистической значимости исключало дальнейшее использование непараметрических критериев. В качестве граничного критерия опровержения нулевой гипотезы принимали $p < 0,05$. Статистический анализ осуществлялся с использованием прикладного пакета SPSS Statistics 17.0.1.

Результаты и обсуждение

Результаты применения специфической иммунотерапии после лучевой терапии у больных РШМ ПВ ст. представлены в табл. 1.

При проведении СИТ была зарегистрирована тенденция к повышению числа лейкоцитов, которая, однако, не характеризовалась достоверными различиями с показателем после проведения СЛТ. Напротив, сохранялось достоверное снижение данного показателя относительно контрольной группы (на 34,7 %, $p < 0,01$).

Тенденция к повышению была выявлена и при анализе содержания лимфоцитов, причём средний показатель в группе СИТ не имел достоверных

различий с контрольной группой, в отличие от СЛТ. Несмотря на наличие умеренной тенденции к повышению числа Т-лимфоцитов в периферической крови, их абсолютное и относительное содержание оставалось ниже показателя контрольной группы (на 21,4 и 14,5 % соответственно, $p < 0,05$ в обоих случаях).

В группе больных, подвергавшихся СЛТ, степень снижения абсолютного содержания $CD3^+CD4^+$ клеток была недостоверной, как и тенденция к повышению при проведении СИТ. Существенных различий по относительному содержанию клеток данного класса в сравниваемых группах не было.

У больных вышеуказанной категории в обеих группах, выделенных в зависимости от проводимой терапии, не было также выявлено существенных особенностей содержания $CD3^+CD8^+$ клеток. При проведении СИТ отмечалось только недостоверное снижение абсолютного и относительного показателей.

Анализ содержания в крови $CD3^+CD56^+CD16^+$ клеток при проведении СЛТ показал наличие достоверного снижения как по абсолютному, так и по относительному показателю.

В то же время при проведении СИТ оба параметра не имели достоверных различий с таковыми в группе контроля, а абсолютное содержание достоверно превышало тот же показатель группы СЛТ (на 36,4 %, $p < 0,05$).

В процессе иммунотерапии была зарегистрирована тенденция к повышению абсолютного и относительного содержания Т-киллеров. Однако, она была недостоверной, и различия с контролем оставались весьма значительными (на 36,7 и 30,2 % соответственно, $p < 0,05$ в обоих случаях).

Наблюдалась также тенденция к увеличению численных показателей уровня В-лимфоцитов, при этом имевшиеся в группе СЛТ достоверные различия с контролем при проведении СИТ отсутствовали. Различия между группами СЛТ и СЛТ+СИТ по показателям содержания $CD4^+CD25^+$ клеток были недостоверны, и во второй группе сохранялись достоверно более низкие их величины в сравнении со средними показателями группы контроля.

Также не было зарегистрировано существенных различий по абсолютному содержанию $CD95^+$ лимфоцитов, относительная величина данного показателя имела тенденцию к снижению.

Динамика роста соотношения $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ привела к его превышению в группе СИТ над контролем, хотя различия во всех случаях были статистически незначимыми.

При сравнении величины индекса активации в группах СЛТ и СЛТ+СИТ заметно, что во втором случае уровень был выше, а различия с контрольной группой – меньшими, чем в первом. Тем не менее, различия между группами больных оставались недостоверными.

У больных РШМ III ст. иммунологическое исследование позволило получить данные, представленные в табл. 2.

Содержание лейкоцитов в крови у больных группы СИТ оставалось сниженным по отношению к контролю, различия были достоверными (на 39,0 %, $p < 0,01$).

В динамике не было зарегистрировано практически никаких изменений в отношении концентрации лимфоцитов, абсолютное содержание иммунокомпетентных клеток данного класса в группе СИТ было сниженным относительно контроля на 25,2 % ($p < 0,05$).

Таблица 1

Динамика показателей клеточного звена иммунитета в зависимости от проводимого лечения у больных РШМ IIВ стадии

Показатель	Контрольная группа, n=45	Больные РШМ IIВ ст.		P1	P2	P3
		СЛТ, n=21	СЛТ+СИТ, n=20			
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	6,51 $\pm$ 0,31	3,93 $\pm$ 0,23	4,25 $\pm$ 0,23	<0,01	<0,01	>0,05
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	2,10 $\pm$ 0,09	1,70 $\pm$ 0,09	1,93 $\pm$ 0,09	<0,05	>0,05	>0,05
CD3 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$	1,45 $\pm$ 0,06	1,08 $\pm$ 0,05	1,14 $\pm$ 0,05	<0,05	<0,05	>0,05
CD3 ⁺ , %	69,0 $\pm$ 2,4	63,5 $\pm$ 2,7	59,1 $\pm$ 2,3	>0,05	<0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$	0,89 $\pm$ 0,05	0,76 $\pm$ 0,05	0,81 $\pm$ 0,05	>0,05	>0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	42,4 $\pm$ 1,9	44,7 $\pm$ 2,4	42,0 $\pm$ 2,1	>0,05	>0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$	0,39 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,02	>0,05	<0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	18,6 $\pm$ 1,1	20,6 $\pm$ 1,5	17,1 $\pm$ 1,2	>0,05	>0,05	>0,05
CD3-CD56 ⁺ CD16 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$	0,17 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01	<0,05	>0,05	<0,05
CD3-CD56 ⁺ CD16 ⁺ , %	8,1 $\pm$ 0,5	6,5 $\pm$ 0,5	7,8 $\pm$ 0,5	<0,05	>0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$	0,11 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	<0,05	<0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ , %	5,3 $\pm$ 0,4	3,5 $\pm$ 0,2	3,7 $\pm$ 0,3	<0,05	<0,05	>0,05
CD19 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$	0,24 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,02	<0,05	>0,05	>0,05
CD19 ⁺ , %	11,4 $\pm$ 0,6	8,8 $\pm$ 0,6	9,8 $\pm$ 0,6	<0,05	>0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$	0,21 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01	<0,05	<0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	10,0 $\pm$ 0,6	8,2 $\pm$ 0,6	8,3 $\pm$ 0,6	<0,05	<0,05	>0,05
CD95 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$	0,91 $\pm$ 0,07	1,08 $\pm$ 0,07	1,05 $\pm$ 0,08	>0,05	>0,05	>0,05
CD95 ⁺ , %	45,3 $\pm$ 2,3	63,8 $\pm$ 4,4	54,4 $\pm$ 4,1	<0,05	>0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺	2,28 $\pm$ 0,13	2,17 $\pm$ 0,15	2,45 $\pm$ 0,17	>0,05	>0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD25 ⁺ /CD95 ⁺	0,24 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,02	<0,01	<0,05	>0,05

P1 – статистическая значимость различий больных с контролем в группе сравнения;

P2 – статистическая значимость с контролем в основной группе;

P3 – статистическая значимость различий показателей между группами больных в зависимости от лечения.

Таблица 2

Динамика показателей клеточного звена иммунитета в зависимости от проводимого лечения у больных РШМ III стадии

Показатель	Контрольная группа, n=45	Больные РШМ III ст.		P1	P2	P3
		СЛТ, n=20	СЛТ+СИТ, n=20			
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	6,51 $\pm$ 0,31	3,68 $\pm$ 0,26	3,97 $\pm$ 0,25	<0,01	<0,01	>0,05
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	2,10 $\pm$ 0,09	1,53 $\pm$ 0,10	1,57 $\pm$ 0,09	<0,05	<0,05	>0,05
CD3 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$	1,45 $\pm$ 0,06	1,02 $\pm$ 0,06	1,08 $\pm$ 0,06	<0,05	<0,05	>0,05
CD3 ⁺ , %	69,0 $\pm$ 2,4	66,7 $\pm$ 3,4	68,8 $\pm$ 3,1	>0,05	>0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$	0,89 $\pm$ 0,05	0,69 $\pm$ 0,06	0,73 $\pm$ 0,05	<0,05	<0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	42,4 $\pm$ 1,9	45,1 $\pm$ 3,0	46,5 $\pm$ 2,7	>0,05	>0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$	0,39 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,02	<0,05	<0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	18,6 $\pm$ 1,1	20,9 $\pm$ 1,8	19,1 $\pm$ 1,5	>0,05	>0,05	>0,05
CD3-CD56 ⁺ CD16 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$	0,17 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	<0,01	<0,01	>0,05
CD3-CD56 ⁺ CD16 ⁺ , %	8,1 $\pm$ 0,5	5,2 $\pm$ 0,4	6,4 $\pm$ 0,5	<0,05	<0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$	0,11 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	<0,01	<0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ , %	5,3 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,2	<0,01	<0,05	<0,01
CD19 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$	0,24 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,02	<0,01	<0,05	>0,05
CD19 ⁺ , %	11,4 $\pm$ 0,6	8,5 $\pm$ 0,7	8,9 $\pm$ 0,6	<0,05	<0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$	0,21 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	<0,01	<0,01	>0,05
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	10,0 $\pm$ 0,6	7,2 $\pm$ 0,6	7,6 $\pm$ 0,6	<0,05	<0,05	>0,05
CD95 ⁺ , $\times 10^9/\text{л}$	0,91 $\pm$ 0,07	1,15 $\pm$ 0,07	1,17 $\pm$ 0,06	<0,05	<0,05	>0,05
CD95 ⁺ , %	45,3 $\pm$ 2,3	75,4 $\pm$ 4,3	74,3 $\pm$ 3,9	<0,01	<0,01	>0,05
CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺	2,28 $\pm$ 0,13	2,16 $\pm$ 0,16	2,43 $\pm$ 0,18	>0,05	>0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD25 ⁺ /CD95 ⁺	0,24 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	<0,01	<0,01	>0,05

P1 – статистическая значимость различий больных с контролем в группе сравнения;

P2 – статистическая значимость с контролем в основной группе;

P3 – статистическая значимость различий показателей между группами больных в зависимости от лечения.

Аналогичные показатели были характерны для абсолютного и относительного содержания CD3⁺ клеток. По первому из них сохранялось статистически значимое снижение по отношению к контролю, по второму – различий зарегистрировано не было.

В динамике была выявлена только умеренная тенденция к повышению содержания CD3⁺CD4⁺ клеток в группе проведения СИТ. Различия с контролем по данному показателю оставались (снижение на 18,0 %; p<0,05). По относительному содержанию клеток данного класса в обеих подгруппах больных имелось статистически незначимое превышение над показателем контроля.

Отмечалось только умеренное и статистически незначимое повышение содержания в крови натуральных киллеров (CD3⁺CD56⁺CD16⁺). По абсолютному показателю превышение над группой СЛТ составило 20,9 %, по относительному – 24,3. В обоих случаях показатели были ниже, чем у здоровых лиц (p<0,01, p<0,05).

Имелось превышение содержания Т-киллеров в группе СЛТ+СИТ над больными, у которых проводилась только СЛТ. Тем не менее, различия с контролем оставались статистически незначимыми (на 45,5 %, p<0,05). По относительной величине данного показателя, напротив, был выявлен рост на

56,0 % ($p < 0,01$). Тем не менее, различия с группой контроля составили 26,4 % ($p < 0,05$).

Не было существенных особенностей в зависимости от проводимой терапии по содержанию $CD19^+$ в крови. Различия по абсолютному значению данного показателя с контролем составили 41,7 %, по относительному – 21,9 ($p < 0,05$ в обоих случаях). Также не отмечалось существенной динамики в отношении уровня активированных Т-хелперов, по обоим исследованным показателям сохранялось статистически значимое снижение в отношении контрольной группы (на 42,9 и 24,0 %; $p < 0,01$; $p < 0,05$ соответственно).

Отмечена тенденция к превышению абсолютного числа $CD3^+CD25^+$ у больных группы СЛТ/СИТ по отношению к женщинам группы СЛТ. Отмечались статистически значимые различия с контролем как по абсолютному ($p < 0,05$), так и по относительному ($p < 0,01$) показателям.

Имелось недостоверное повышение иммунорегуляторного индекса в группе больных, получавших СИТ, по отношению как к контролю, так и к группе СЛТ.

Тенденция к превышению уровня индекса активации никак не повлияла на степень значимости различий по данному показателю с контролем при проведении СИТ. Они составили 54,2 % ($p < 0,01$).

Заключение

Анализ полученных данных свидетельствует о наличии некоторых различий численных показате-

телей системы иммунитета у больных раком шейки матки в группах проведения СЛТ и иммунотерапии после лучевой терапии. Так, применение иммунотерапии позволило добиться определенного увеличения абсолютного и относительного содержания натуральных киллеров и НКТ-клеток.

В то же время, мы полагаем, что сохраняющиеся различия с контрольной группой по содержанию ключевых факторов клеточного противоопухолевого иммунитета в сторону снижения свидетельствуют о сохраняющемся и на фоне СИТ вторичном иммунодефиците.

При интерпретации его клинического значения следует учитывать сохраняющийся после СЛТ большой объем ткани опухоли, в том числе клеток, способных к делению, за счет которых развиваются рецидивы и отдаленные метастазы в период после осуществления терапии.

Функциональные возможности клеточных механизмов иммунной системы, подвергавшихся, вдобавок, негативному воздействию в ходе лучевой терапии, могут оказаться недостаточными для элиминации или подавления активности сохранившихся клеток новообразования.

Поэтому мы полагаем, что изолированное использование методики СИТ при отсутствии устранения основного объема новообразования путем оперативного вмешательства является мерой, снижающей риск рецидива или развития метастазов, однако, недостаточной и могущей быть потенцированной применением средств и методов неспецифической активации клеточного иммунитета.

Литература

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М.: Практика, 1998. – 459 с.
2. Aguilar L.K., Guzik B.W., Aguilar-Cordova E. Cytotoxic immunotherapy strategies for cancer: mechanisms and clinical development // J Cell Biochem. – 2011. – 112(8). – P. 1969–77.
3. Berzofsky J.A., Terabe M., Wood L.V. Strategies to use immune modulators in therapeutic vaccines against cancer // Semin Oncol. – 2012. – 39(3). – P. 348–57.
4. van den Broek M., von Boehmer L., Knuth A. Developments in cancer immunotherapy // Dig Dis. – 2010. – 28(1). – P. 51–6.
5. Inamoto T., Azuma H. Immunotherapy of genitourinary malignancies // J Oncol. – 2012. – 2012. – ID 397267.
6. Gajewski T.F. Cancer immunotherapy // Mol Oncol. – 2012. – 6(2). – P. 242–50.
7. George S., Pili R., Carducci M.A., Kim J.J. Role of immunotherapy for renal cell cancer in 2011 // J Natl Compr Canc Netw. – 2011. – 1;9(9). – P. 1011–8.
8. Hersey P. Immunotherapy of melanoma // Asia Pac J Clin Oncol. – 2010. – 6 Suppl 1. – S 2–8.
9. Krieger N., Bassett M.T., Gomez S.L. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010 // Lancet. – 2012. – 14;379(9824). – P. 1391–2.
10. Pandolfi F., Cianci R., Pagliari D. et al. The immune response to tumors as a tool toward immunotherapy // Clin Dev Immunol. – 2011. – 2011. – ID 894704.
11. Stan R., Wolchok J.D., Cohen A.D. DNA vaccines against cancer // Hematol Oncol Clin North Am. – 2006. – 20(3). – P. 613–36.

Список сокращений

РШМ	– рак шейки матки
СЛТ	– сочетанная лучевая терапия

УДК 616.155.392.2-036.1-092.9:615.277.2:577.115

*Е.В. Моисеева¹, Н.Р. Кузнецова¹, Д.А. Аронов¹, Н.С. Ситников², А.Ю. Федоров², Н.В. Бовин¹, Е.Л. Водовозова¹***ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛИПОСОМ
С ЛИПОФИЛЬНЫМ ПРОЛЕКАРСТВОМ КОМБРЕТАСТАТИНА А4
НА МОДЕЛИ ОСТРОГО Т-ЛИМФОЛЕЙКОЗА МЫШЕЙ**¹Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород**Контактная информация:***Водовозова Елена Львовна, заведующая лабораторией химии липидов ИБХ РАН***адрес:** 117997, ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10; **тел.:** +7(495)330-6610**e-mail:** elvod@lipids.ibch.ru

Статья поступила 24.12.12, принята к печати 01.02.13.

Резюме

С целью повышения эффективности антивазкулярного противоопухолевого средства комбретастина А-4 (СА-4) получены наноразмерные липосомы, нагруженные липофильным пролекарством СА-4 (15 мол. %) и несущие углеводный лиганд селектинов SiaLe^X. Исследован противоопухолевый эффект липосом на модели острого Т-лимфолейкоза мышей ASF-LL. В используемых дозировке (22 мг/кг) и протоколе введения (6 раз с интервалом в 2-3 дня, начиная через сутки после перевивки опухоли) СА-4 не показал достоверного ингибирования роста лимфомы и регионарных подмышечных лимфоузлов; группы, пролеченные препаратами SiaLe^X- и безадресных липосом, достоверно отличались от контроля, начиная с 12 дня, но не различались между собой. Средний размер лимфоузлов у мышей, получавших липосомы, не превысил нормы. К 21 дню был обнаружен единственный показатель преимущества лечения SiaLe^X-липосомами: доля мышей с пораженными лимфоузлами была наименьшей.

Однако к 40 дню выживание в группах женщин, получавших препараты липосом, оказалось наименьшим. Обсуждается вероятность стимулирования лейкоэмической составляющей болезни за счет недостаточного ингибирования роста лимфомы.

Ключевые слова: антивазкулярные средства, комбретастин А-4, Т-клеточная лимфома, липосомы, сиалил-Льюис X.

*E.V. Moiseeva¹, N.R. Kuznetsova¹, D.A. Aronov¹, N.S. Sitnikov², A.Yu. Fedorov², N.V. Bovin¹, E.L. Vodovozova¹***ANTITUMOR EFFECT OF LIPOSOMES LOADED
WITH A LIPOPHILIC PRODRUG OF COMBRETASTATIN A4
IN THE MOUSE MODEL OF T-CELL ACUTE LEUKEMIC LYMPHOMA**¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of RAS, Moscow²N.I. Lobachevsky Nizhny Novgorod State University, Nizhny Novgorod**Abstract**

To increase the efficiency of an antivasular anticancer drug combretastatin A-4 (CA-4), nanosized liposomes bearing a lipophilic prodrug of CA-4 (15% by mol) and equipped with a selectin-targeted carbohydrate ligand SiaLe^X were prepared. Antitumor effect of the liposomes was studied in the mouse model of T-cell acute leukemic lymphoma ASF-LL. Under studied dosage (22 mg/kg) and administration protocol (total of 6 injections, every 2-3 days each, starting from the first day after tumor inoculation), intact CA-4 did not produce any reliable inhibition of growth of lymphoma or regional lymph nodes; groups treated with SiaLe^X- or nontargeted liposomes were significantly different from control starting from day 12, but were not different from one another. Mean size of lymph nodes in mice treated with liposomes was not larger than in healthy animals. By day 21 the only advantageous factor of the treatment with SiaLe^X-liposomes was observed: the share of mice with affected lymph nodes was the least.

However, by day 40, survival in liposomes-treated groups was the lowest. We discuss a probable stimulation of leukemic constituent of the disease by liposomes caused by insufficient inhibition of the lymphoma.

Key words: antivasular agents, combretastatin A4, T-cell lymphoma, liposomes, Sialyl Lewis X.

Введение

Ангиогенез является ключевым моментом патогенеза злокачественных опухолей, поэтому препараты, действующие на систему кровоснабжения злокачественных новообразований, привлекают все большее внимание специалистов. Антиангиогенные средства блокируют образование сосудов *de novo*; также интерес представляют антивазкулярные средства, разрушающие уже образовавшиеся сосуды опухоли и вызывающие тем самым снижение скорости кровотока в опухоли, гипоксию и, в итоге, некроз опухоли [18].

Комбретастин А4 (СА-4, рис. 1) – антимитотический агент растительного происхождения, блокатор колхицинового сайта тубулина – относительно недавно был предложен в качестве антивазкулярного средства для сочетанной терапии солидных опухолей [18]. В настоящее время СА-4 в форме водорастворимого фосфата (СА4Р) проходит III фазу клинических испытаний. Однако ранее было показано, что при химиотерапии антивазкулярными средствами, в том числе СА4Р, разрушаются и сосуды нормальных тканей – сердца, мозга, селезенки, кожи и почек пациентов, что может стать причиной серьезных осложнений [14].

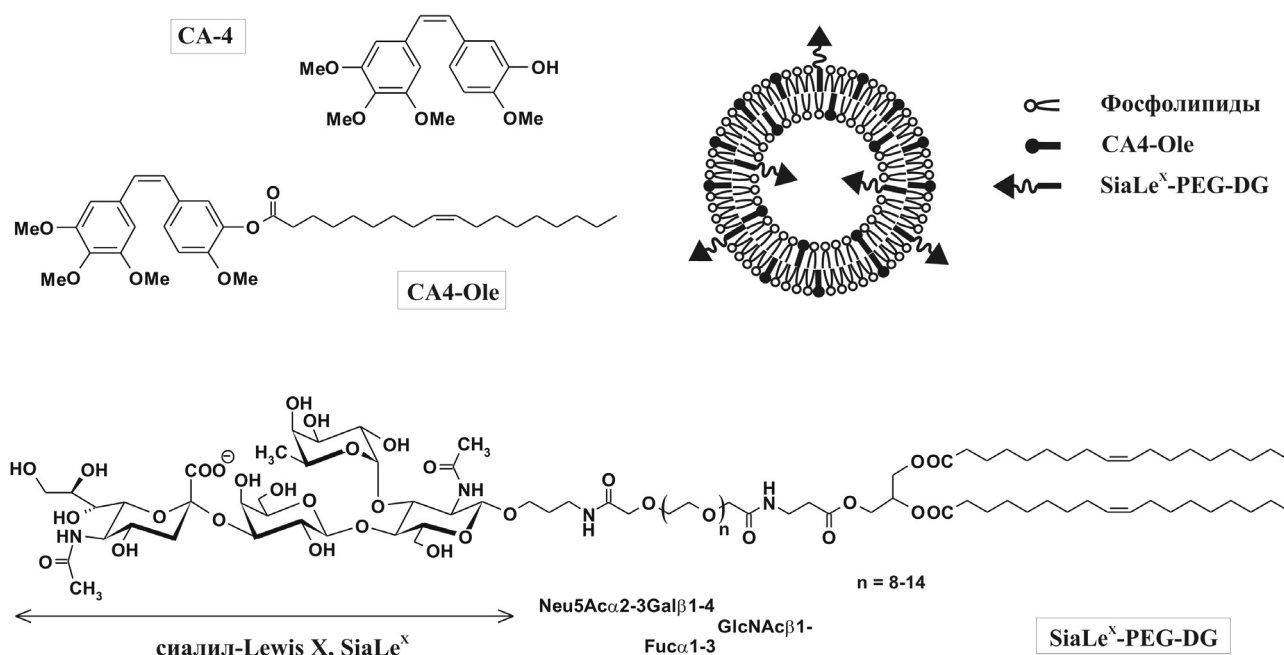


Рис. 1. Структуры комбретастина А-4 (CA-4), липофильного пролекарства CA4-Ole, липофильного конъюгата SiaLe^x и схематическое изображение адресной липосомы с пролекарством.

Кроме того, в режиме монотерапии в экспериментах на животных данные средства обычно эффективны только в дозах, превышающих толерантные [11].

Мы предположили, что изменение биораспределения CA-4 путем нацеливания на сосуды опухоли может улучшить терапевтическую эффективность этого агента. Стратегия применения наноразмерных (диаметра 100–150 нм) липосом в качестве носителей для доставки лекарств в опухоли при системном введении хорошо обоснована и обсуждается во многих международных изданиях (например, [7]). Однако приемлемый с точки зрения технологии способ, позволяющий включать во внутренний объем наноразмерных липосом терапевтически значимые количества водорастворимых препаратов – метод активной загрузки (*remote loading*) против градиентов концентраций солей – реализуем только для ограниченного числа лекарств, имеющих структуру амфифильных слабых кислот или оснований, например, антибиотиков антрациклинового ряда типа доксорубина [10; 20]. Комбретастин А-4 представляет собой небольшую гидрофобную молекулу, которую целесообразно включать в аполярную часть липидного бислоя. Действительно, были получены липосомы, содержащие CA-4 в липидном бислое и нацеленные с помощью циклического RGD-пептида на αvβ3-интегрины ангиогенного эндотелия [15]. Однако емкость загрузки таких липосом CA-4 составила менее 3 мольн. % из-за «вытекания» лекарства из бислоя в течение нескольких часов, и они не использовались далее для системного введения животным. Таким образом, для надежного удерживания в липосомах за счет гидрофобных взаимодействий молекула CA-4 должна быть модифицирована дополнительным алкильным мембранным якорем, который будет отщепляться внутриклеточными ферментами после эндоцитоза липосом.

Недавно нами было показано на модели спонтанного рака молочных желез мышей BLRB, что липосомы с липофильным пролекарством CA-4 – олеоильным производным CA4-Ole (рис. 1), –

несущие тетрасахаридный лиганд селектинов сиалил-Lewis X (SiaLe^x), значительно подавляют рост опухоли в режиме монотерапии всего лишь после трехкратного (1 раз в неделю) внутривенного введения [3]. Ранее на мышах той же линии с перевитым раком молочных желез продемонстрировано значительное усиление противоопухолевого эффекта при оснащении SiaLe^x-тетрасахаридом липосом, нагруженных липофильным пролекарством сарколизина [19].

Селектины (углеводсвязывающие адгезионные белки) повышено экспрессированы на активированных эндотелиальных клетках, лейкоцитах и тромбоцитах. Они участвуют во взаимодействиях между лейкоцитами и эндотелиальными клетками и играют ключевую роль во множестве (пато)физиологических процессов, в том числе – в развитии воспалительного ответа, метастазирования и пр., будучи посредниками активации эндотелия и роллинга лейкоцитов [5].

Недавно решающая роль Е- и Р-селектинов в формировании спонтанных метастазов впервые была доказана *in vivo* на мышинной модели рака кишечника [12].

Цель настоящей работы – получение липосомальных форм, в том числе – оснащенных SiaLe^x-лигандом, липофильного пролекарства CA-4 (CA4-Ole, рис. 1) и изучение их противоопухолевого действия на модели острого Т-лимфолейкоза мышей ASF-LL [4] в сравнении с исходным CA-4. Экспрессия селектинов на клетках лимфомы ASF-LL подтверждена с помощью иммунофенотипирования проточной цитофлуориметрией [4]. Известно, что Т-клеточные лимфомы отличаются низкой иммуногенностью, быстрым агрессивным течением и слабым ответом на стандартную химиотерапию [6]. Мышинная модель ASF-LL характеризуется появлением лейкоэмической составляющей в крови на 2–3 неделю после подкожной перевивки опухоли и ростом лимфомы во всех изученных органах мыши, включая лимфатические узлы, костный мозг, селезенку, почки, печень, легкие и др.

Материалы и методы

Олеоильное производное комбретастина А4 CA4-Ole и диглициридный конъюгат SiaLe^X-PEG-DG (рис. 1) синтезировали как описано ранее [3].

Приготовление дисперсий лекарственных липосом

Использовали фосфатидилхолин (PC) из яичного желтка и фосфатидилинозит (PI) из *S. cerevisiae* производства «Реахим» (Россия). Готовили буфер с 1 mM EDTA: PBS, pH 7,06 – физиологический раствор на фосфатном буфере (KH₂PO₄; 0,2 г/л; NaH₂PO₄·2H₂O, 0,15 г/л; Na₂HPO₄ 1,0 г/л; KCl, 0,2 г/л; NaCl, 8,0 г/л).

Смеси PC/PI/CA4-Ole(+/-SiaLe^X-PEG-DG), 7,5:1:1,5:(+/-0,1) (мол.) упаривали в круглодонных пробирках из растворов в хлороформе с метанолом (1 : 1) на ротационном испарителе при температуре не выше 40 °С. Смеси содержали по 54 мг PC, 8 мг PI, 8 мг (14 мкмоль) CA4-Ole и 2 мг SiaLe^X-PEG-DG (~0,94 мкмоль). Липидные пленки высушивали 30 мин при 5 Па, затем гидратировали в течение 2 ч при комнатной температуре в 2 мл буфера PBS. Суспензию встряхивали, подвергали 5-кратной процедуре замораживания – оттаивания (жидкий азот – +40 °С) и продавливали 20 раз через поликарбонатные мембранные фильтры (Nucleopore, США) с размером пор 100 нм с помощью установки Mini-extruder от Avanti Polar Lipids (США). Размер липосом измеряли на установке Brookhaven Particle Analyzer 90+ (США). Концентрации пролекарств в дисперсиях определяли после разрушения липосом 20-кратным разбавлением в этаноле: регистрировали УФ-спектры и измеряли оптическую плотность в максимумах поглощения (CA4-Ole: λ_{макс.} = 287 нм, ε ~13440) на двухлучевом спектрофотометре СФ-256-УВИ (Ломофотоника, С.-Петербург). Потери пролекарств на фильтрах контролировали, определяя их количество в растворах, полученных вымачиванием фильтров в этаноле, с последующей регистрацией УФ-спектров; потери составляли не более 3 %. Состав липосом определяли после гель-хроматографии на колонке с Сефарозой CL-4В, анализируя фракции на фосфолипидный фосфор колориметрическим методом и на пролекарства – спектрофотометрически, как описано ранее для других препаратов [1]. Дисперсии липосом хранили при +4 °С не более 4 суток.

Испытания противоопухолевой активности

В работе были использованы мыши инбредной линии A/WySnJCitMoise (далее A/Sn). Мышей разводили и поддерживали в конвенциональных условиях вивария ИБХ РАН. Опухолевые клетки лейкемической лимфомы ASF-LL перевивали сингенным самкам (n=34) в дозе 10⁶ клеток на мышью подкожно под правую переднюю лапу. На вторые сутки после перевивки опухолей мышам вводили в хвостовую вену по 0,2 мл 7 mM раствора CA-4 (22 мг/кг) в PBS–5% Tween 80 (n=8, группа 1), или дисперсий липосом состава PC/PI/CA4-Ole, 7,5 : 1 : 1,5 (мол.; n=8, группа 2) и PC/PI/CA4-Ole/SiaLe^X-PEG-DG, 7,5:1:1,5:0,1 (мол.; n=8, группа 3) в эквивалентной по CA-4 дозе. Инъекции повторяли еще 5 раз с интервалами в 2-3 дня, а именно: на 4; 7; 9; 12 и 15 сутки после перевивки опухоли. Мышам контрольной группы одновременно вводили буфер PBS–5% Tween 80 таким же образом (n=10, группа К). Размеры регионарных (подмышечных) лимфа-

тических узлов и опухоли до 2–3 мм оценивали методом пальпирования, и далее измеряли размер опухоли с помощью штангенциркуля каждые 2–3 дня. Ежедневно оценивали состояние здоровья животных и регистрировали выживаемость. Противоопухолевый эффект оценивали по торможению роста подкожной опухоли и регионарных лимфатических узлов. Средний объем опухолей (в мм³) в контрольной и опытной группах определяли для каждой солидной опухоли как произведение трех размеров перпендикулярных диаметров опухолевого узла. Средний диаметр лимфатических узлов (в мм) вычисляли, как сумму трех размеров перпендикулярных диаметров узла, деленную на три [19].

Статистическую обработку полученных результатов проводили по критерию Стьюдента (двухконцевой t-критерий).

Результаты и обсуждение

Липосомы получали из смесей природных фосфолипидов – яичного фосфатидилхолина и фосфатидилинозита из пекарских дрожжей – с пролекарством CA4-Ole и SiaLe^X-конъюгатом стандартным методом экструзии через 100 нм-фильтры [1]. При этом образуются мономеллярные (с единственным липидным бислоем) липосомы заданного размера, несущие модифицированное лекарство и углеводный лиганд. Схематически конструкция липосомы изображена на рис. 1. Контакт с рецептором на поверхности клетки-мишени обеспечивается за счет экспонирования углеводных групп SiaLe^X на достаточном расстоянии от мембраны с помощью полярных гибких вставок короткоцепочечного (степень полимеризации 8–14) полиэтиленгликоля (ПЭГ). По данным динамического лазерного светорассеяния, для разных препаратов средний диаметр липосом составил от 89±30 нм до 94±31 нм.

Известные липосомы Stealth®, несущие на поверхности длинноцепочечные остатки ПЭГ для защиты от преждевременного вывода из кровотока клетками ретикуло-эндотелиальной системы, формируются из фосфолипидов, содержащих насыщенные ацильные остатки (обычно – гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин), и холестерина (до 30%), так как для уменьшения утечки препарата в кровоток необходима жесткая мембрана [10; 20]. Липофильные пролекарства сами являются компонентами липидного бислоя и при его повреждении не покидают липосому, как показано нами для липидных конъюгатов водорастворимых лекарств [1]. Жидкий липидный бислой способен включить больше пролекарства. Более того, он легче сливается с мембранами опухолевых клеток [8]. В нашем случае основу бислоя липосом (более 80 мол. %) составляют фосфолипиды, содержащие примерно половину насыщенных ацильных остатков (пальмитиловых и стеариловых), а остальные – ненасыщенные олеиловые и меньшее количество линолеиловых остатков. Фосфатидилинозит (PI) введен в состав для стабилизации липосом в кровотоке, вместо ПЭГ-фосфатидилэтаноламина, используемого в липосомах Stealth®. Остатки миоинозита молекул PI, составляющих примерно 10% бислоя, создают на поверхности мембраны высокогидратированную стерически стабилизирующую оболочку, подобно остаткам ПЭГ [9]. Нежелательные побочные эффекты при лечении Stealth®-липосомами обусловлены именно полиэтиленгликолем: длинноцепочечный ПЭГ (степень полимеризации 45–48), несмотря на

отсутствие собственной токсичности и иммуногенности, будучи на поверхности липосом вызывает у значительной части пациентов реакции гиперчувствительности средней и тяжелой степени, вплоть до анафилактического шока, связанные с активацией системы комплемента [17].

Содержание пролекарства в липосомах определяли спектрофотометрически после фракционирования дисперсий гель-хроматографией, как описано ранее для других препаратов [1]. Емкость включения субстанции СА4-Ole в липосомы составила 15 мол. %, причем пролекарство практически без потерь (то есть с эффективностью близкой к 100 %) включалось в липидный бислой. Доза СА-4, применяемая для одноразовой инъекции животным-опухоленосителям, весьма высока, поэтому емкость носителя в данном случае особенно важна.

Для проведения сравнительной оценки противоопухолевого действия различных форм комбrestaина А-4 *in vivo* с применением дозировки, принятой в клинике, необходимо было использовать водорастворимую форму лекарства в виде фосфата СА4Р в дозе 81 мг/кг (то есть молярная дозировка 184 мкмоль/кг). В данном же случае работа проделана с водонерастворимым СА-4, для получения раствора которого в мицеллярной форме применяли фармакопейный детергент Tween 80. Детергент сам по себе в использованной концентрации – 5 % в буфере – проявил некоторую токсичность (тенденция к уменьшению веса животных в контрольной группе, рис. 2). Максимальная концентрация СА-4, которую удалось получить с 5%-ным Tween 80, позволила применить для введения в хвостовую вену мышам-реципиентам лишь дозу 22 мг/кг (70 мкмоль/кг в 200 мкл). Поэтому сравнение противоопухолевого эффекта двух форм антимитотического агента СА-4 – в виде раствора с Tween 80 (мицеллярной) и в виде дисперсий липосом с пролекарством СА4-Ole – было проведено в указанной эквивалентной дозировке (70 мкмоль/кг).

На рис. 2 приведена динамика относительного изменения веса животных по группам в ходе эксперимента. Препараты вводили 6 раз с интервалом в 2–3 дня, начиная со вторых суток после перевивки опухолей. Токсичность мицеллярной формы СА-4 (группа 1) практически не отличалась от токсичности контрольного раствора Tween 80 в буфере: уменьшение среднего веса на 14 день (после 5 инъекций) не было статистически достоверным, по сравнению с контролем. Однако обе липосомальные формы проявили очевидную токсичность (группы 2 и 3; отличие от контроля на 14 день $p \leq 0,042$). Ранее на этой же модели Т-клеточного лимфолейкоза мы также наблюдали уменьшение веса стареющих мыш-реципиентов линии A/Sn под действием липосомальных препаратов с липофильным пролекарством метотрексата (неопубл. данные). В то же время, на модели рака молочных желез подобного эффекта не наблюдалось [19], равно как и при лечении мыш-реципиентов с экспериментальным лимфолейкозом Р-388 (правда, в последнем случае препараты вводили мышам DBA/2 внутрибрюшинно [2]). Можно предположить, что токсичность липосом объясняется их накоплением в таких органах-мишенях наночастиц, как печень и почки: возможно, при Т-лимфолейкозе повышается активность макрофагов, которые и доставляют липосомы с антивазкулярным агентом в эти органы. Кроме того, мыши линии A/Sn при содержании в конвенциональных условиях характеризуются сравнительно высокой частотой воспалительных процессов в почках.

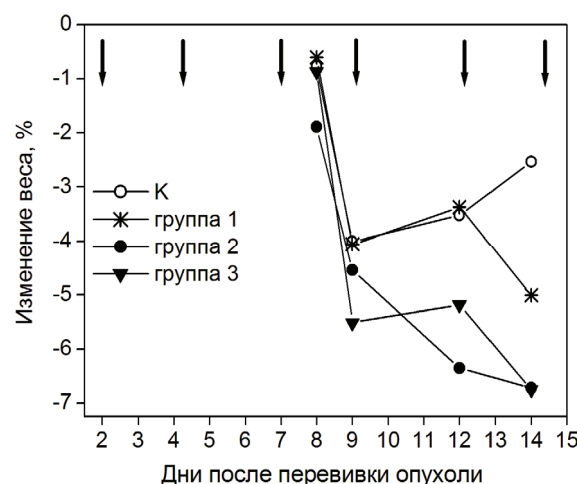


Рис. 2. Динамика относительного изменения веса (%) по группам мыш-реципиентов ASF-LL с перевивкой Т-лимфомы при лечении препаратами комбrestaина А-4. Через сутки после инокуляции клеток лимфомы самкам вводили внутривенно 6 раз с интервалом в 2–3 дня по 0,2 мл препаратов: PBS–5% Tween 80 (контроль, К, n=10), раствор СА-4 (22 мг/кг) в PBS–5% Tween 80 (группа 1, n=8), СА4-Ole в эквивалентной дозе в липосомах (группа 2, n=8) или в адресных SiaLe^X-липосомах (группа 3, n=8). Изменение веса на день *n* после перевивки опухоли (вес_n) по отношению к начальному весу (вес₀) вычисляли для каждой самки индивидуально как (вес_n / вес₀ – 1) × 100%. Стрелками отмечены дни введения препаратов.

В используемых дозировке и протоколе введения мицеллярный СА-4 не показал достоверного ингибирования роста лимфомы (группа 1, рис. 3а) и регионарных, то есть лежащих в области роста лимфомы, подмышечных лимфоузлов, по сравнению с контролем (рис. 3б). Тогда как скорость роста подкожной лимфомы мыш-реципиентов группы 2, получавшей липосомальный препарат с пролекарством СА4-Ole, была достоверно снижена по сравнению с ростом в контроле, начиная с 14 суток ($p = 0,032$), то есть после 5-ти инъекций. Близкую динамику торможения роста лимфомы показал и препарат SiaLe^X-липосом (группа 3): на 15 сутки он достоверно ($p = 0,005$) ингибировал рост опухоли. Однако оба липосомальных препарата по эффективности не различались между собой (рис. 3а), а максимальное отличие от мицеллярной формы СА-4 (группа 1), наблюдающееся на 21 день в группе 2, не достигало достоверности ($p = 0,151$).

Оба липосомальных препарата достоверно ингибировали рост регионарных лимфоузлов, начиная с 15 дня (отличия от контроля $p \leq 0,056$; рис. 3б), причем SiaLe^X-липосомы (группа 3) по действию статистически достоверно отличались от мицеллярной формы СА-4 (группа 1; $p = 0,088$).

Наглядно видно, что средний диаметр лимфатических узлов у мыш-реципиентов, получавших липосомальные формы, в это время не вышел за пределы нормы (до 2 мм).

К 21 дню эксперимента был обнаружен фактически единственный показатель преимущества адресных липосом: доля мыш-реципиентов с пораженными лимфоузлами была наименьшей в группе, пролеченной SiaLe^X-липосомами с СА4-Ole (группа 3, рис. 4).

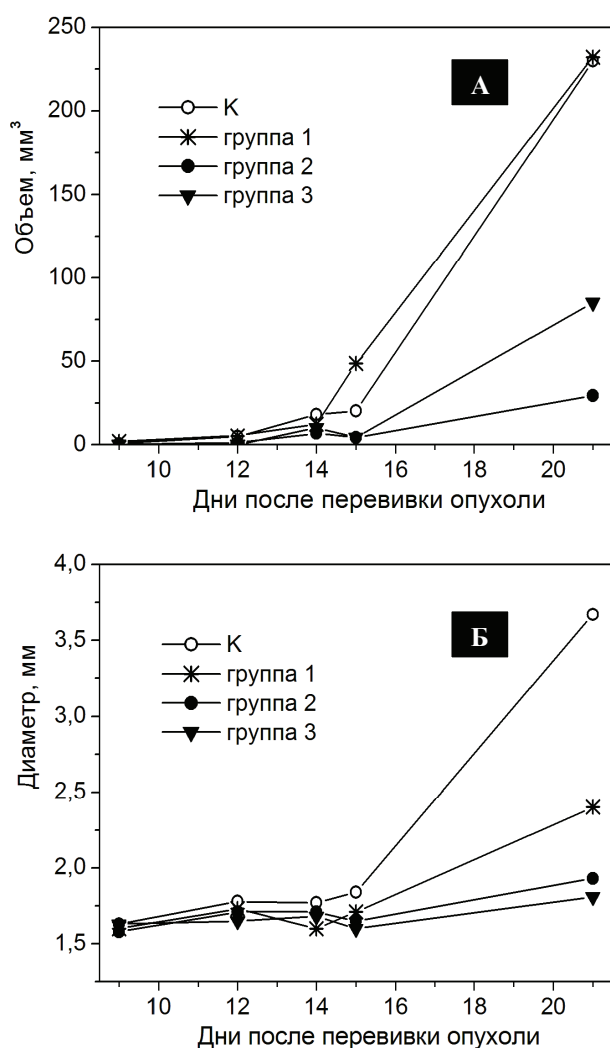


Рис. 3. Динамика роста опухоли (а) и динамика роста регионарных лимфатических узлов (б) по группам мышей ASF-LL с перевитой Т-лимфомой при лечении препаратами комбретастина А-4. См. подпись к рис. 2.

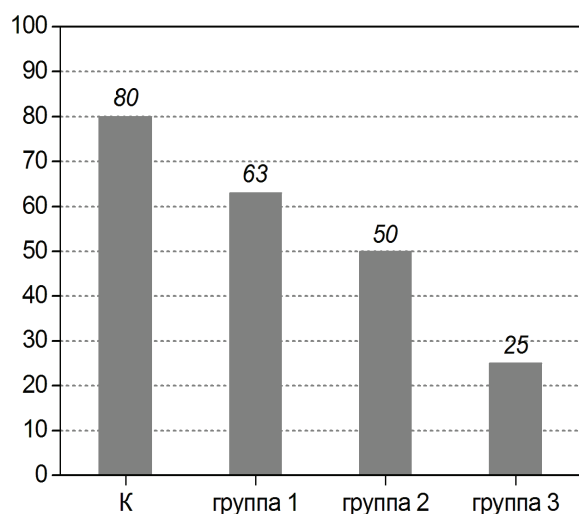


Рис. 4. Доля (в %) мышей ASF-LL с пораженными лимфатическими узлами по группам (см. подпись к рис. 2) при лечении препаратами комбретастина А-4 к 21 дню после перевивки Т-лимфомы.

Однако к 40 дню эксперимента выживание в группах 2 и 3, животных, получавших липосомальные препараты, оказалась наименьшим – по 12,5 % (то есть по 1 животному из 8). В то же время, обработка мышей мицеллярной формой СА-4 практически не повлияла на выживание: в группе 1 оно составило 25 % (2 мыши из 8), а в контрольной – 30 % (3 из 10). Объяснение такого результата может быть следующим. Липосомальные препараты достоверно затормозили не только рост подкожной лимфомы, но и процесс поражения регионарных лимфатических узлов (рис. 3). Последнее подразумевает преимущественное разрушение именно лимфатических сосудов, дренирующих опухоль, что согласуется с известным фактом лимфотропности наноразмерных носителей [13]. По-видимому, обе липосомальные формы лекарства (в отличие от мицеллярной формы) поразили лимфатические сосуды опухоли в более значительной степени, чем кровеносные, способствуя, тем самым, выходу опухолевых клеток в кровяное русло. В результате могла быть простимулирована лейкемическая составляющая Т-лимфолейкоза, которая, собственно, и является причиной смерти опухоленосителей. Возможно, для значительного ингибирования лейкемической составляющей лимфомы липосомальные препараты с пролекарством СА-4 необходимо вводить более продолжительное время.

В работе Pattillo с соавт. [16] однократная инъекция интактного водорастворимого фосфата СА4Р мышам с перевитыми клетками рака молочной железы МСА-4 в дозировке, принятой в клинике (81 мг/кг), не ингибировала рост опухоли. Заметное торможение роста достигалось лишь при введении препарата после облучения опухоли (примерно на 30 % в первые 10 дней), причем кривая роста опухоли практически совпадала с кривыми, полученными после облучения без применения какого-либо препарата, либо после 4 инъекций СА4Р через день. Сильное ингибирование роста опухоли (примерно на 80 % в течение 15-20 дней) было достигнуто в результате введения СА4Р (15 мг/кг) в Stealth-иммунолипосомах, несущих полноразмерное МКА к Е-селектину, причем только после облучения опухоли, которое значительно увеличивало экспрессию селектинов [16]. Без облучения действие иммунолипосом на рост опухолей практически не отличалось от действия СА4Р после облучения, только доза вводимого в липосомах препарата была меньше в 5,4 раза (36 мкмоль/кг). Однако в случае Т-лимфолейкоза облучение вряд ли может быть использовано для адресной стимуляции экспрессии селектинов.

Заключение

Применение антимиотического агента комбретастина А-4 в качестве антивазкулярного противоопухолевого средства для системного введения может быть усовершенствовано за счет включения его липофильного пролекарства в липосомы, оснащенные специфическим для сосудистого эндотелия опухолей углеводным лигандом SiaLe^X. Результаты испытаний на модели острого Т-лимфолейкоза мышей показывают перспективность применения СА4-Ole в SiaLe^X-липосомах, однако необходимо усовершенствовать режим лечения. Для получения значительного противоопухолевого эффекта необходимо увеличить кратность введения препаратов липосом. Очевидно, недостаточное ингибирование роста подкожной лимфомы приводит к ускорению развития лейкемической составляющей болезни.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 10-04-01021-а).

Литература

1. Водовозова Е.Л., Кузнецова Н.Р., Кадыков В.А. и др. Липосомы как нано-носители липидных конъюгатов противоопухолевых агентов мелфалана и метотрексата // Рос. нанотехнологии. – 2008. – 3(3-4). – P. 162–72.
2. Козлов А.М., Корчагина Е.Ю., Водовозова Е.Л. и др. Усиление противоопухолевой активности сарколизина путем превращения его в липидное производное и включения в мембрану липосом, содержащих углеводный вектор // Бюлл. exper. биол. мед. – 1997. – 123(4). – P. 439–41.
3. Ситников Н.С., Болдырев И.А., Моисеева Е.В. и др. Противоопухолевые липосомы с пролекарством комбретастина А-4 и тетрасахаридным лигандом селектинов // Изв. РАН, Сер. Хим. – 2010. – №12. – С. 2234–9.
4. Чаадаева А.В., Тепкеева И.И., Моисеева Е.В. и др. Противоопухолевая активность пептидного экстракта лекарственных растений РЕ-РМ на новой мышиной модели Т-лимфолейкоза // Биомед. химия. – 2009. – 55. – P. 81–8.
5. Ehrhardt C., Kneuer C., Bakowsky U. Selectins - an emerging target for drug delivery // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2004. – 56. – P. 527–49.
6. Erter J., Alinari L., Darabi K. et al. New targets of therapy in T-cell lymphomas // Curr. Drug Targets. – 2010. – 4. – P. 482–93.
7. Fenske D.B., Cullis P.R. Liposomal nanomedicines // Expert Opin. Drug Deliv. – 2008. – 5. – P. 25–44.
8. Funaki N.O., Tanaka J., Kohmoto M. et al. Membrane fluidity correlates with liver cancer cell proliferation and infiltration potential // Oncol. Rep. – 2001. – 8. – P. 527–32.
9. Gabizon A., Papahadjopoulos D. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1988. – 85. – P. 6949–53.
10. Gabizon A., Schmeeda H., Barenholz Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin: a review of animal and human studies // Clin. Pharmacokinet. – 2003. – 42. – P. 419–36.
11. Grosios K., Holwell S.E., McGown A.T. et al. In vivo and in vitro evaluation of combretastatin A-4 and its sodium phosphate prodrug // Br. J. Cancer. – 1999. – 81. – P. 1318–27.
12. Köhler S., Ullrich S., Richter U., Schumacher U. E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung // Br. J. Cancer. – 2010. – 102(3). – P. 602–9.
13. Maeda H., Sawa T., Konno T. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS // J. Control. Release. – 2001. – 74. – P. 47–61.
14. Murata R., Overgaard J., Horsman M.R. Comparative effects of combretastatin A-4 disodium phosphate and 5,6-dimethylxanthene-4-acetic acid on blood perfusion in a murine tumour and normal tissues // Int. J. Radiat. Biol. – 2001. – 77. – P. 195–204.
15. Nallamothu R., Wood G., Pattillo C.B. et al. A tumor vasculature targeted liposome delivery system for combretastatin A4: design, characterization, and in vitro evaluation // AAPS PharmSciTech. – 2006. – 7(2). – P. E1–E10.
16. Pattillo C.B., Venegas B., Donelson F.J. et al. Radiation-guided targeting of combretastatin encapsulated immunoliposomes to mammary tumors // Pharm. Res. – 2009. – 26. – P. 1093–100.
17. Szebeni J., Muggia F., Gabizon A., Barenholz Y. Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: Prediction and prevention // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2011. – 63. – P. 1020–30.
18. Thorpe P.E. Vascular targeting agents as cancer therapeutics // Clin. Cancer Res. – 2004. – 10. – P. 415–27.
19. Vodovozova E.L., Moiseeva E.V., Grechko G.K. et al. Antitumour activity of cytotoxic liposomes equipped with selectin ligand SiaLe^x, in a mouse mammary adenocarcinoma model // Eur. J. Cancer. – 2000. – 36. – P. 942–9.
20. Zucker D., Marcus D., Barenholz Y., Goldblum A. Liposome drugs' loading efficiency: A working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties // J. Control Release. – 2009. – 139. – P. 73–80.

**НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ
РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН**



УДК 616.24-006.6-008.851:612.015.348

*Р.Н. Белоногов¹, Н.М. Титова², А.А. Савченко^{1,3}***ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТИОЛОВОГО ГОМЕОСТАЗА
В ЭРИТРОЦИТАХ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО
НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ**¹*Красноярский государственный медицинский университет*²*Сибирский федеральный университет, Красноярск*³*НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, Красноярск**Белоногов Роман Николаевич, к.б.н., старший преподаватель кафедры патологической физиологии с курсом клинической патофизиологии им. В.В. Иванова***адрес:** 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка 1з; **тел.** +7(913)533-62-95**e-mail:** ro-x@ya.ru

Статья поступила 17.08.2012, принята к печати 30.10.2012.

Резюме

С целью определения особенностей редокс-зависимой модификации белков и состояния глутатионного звена антиоксидантной системы у больных раком легкого в зависимости от стадии заболевания обследовано 116 пациентов. В эритроцитах проводилось определение уровня карбонильных производных, тиоловых групп белков, восстановленного глутатиона, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы. Наиболее выраженное возрастание интенсивности процессов редокс-зависимой модификации белков в эритроцитах происходит на II и IV стадиях рака легкого, в то же время характер изменений глутатионного звена антиоксидантной системы совпадает только на первых трех стадиях рака легкого. На IV стадии изменения показателей редокс-зависимой модификации белков и глутатионного звена антиоксидантной системы разнонаправлены.

Ключевые слова: рак легкого, окислительный стресс, окислительная модификация белков, система глутатиона.

*R.N. Belonogov¹, N.M. Titova², A.A. Savchenko^{1,3}***CHANGES IN THIOL HOMEOSTASIS
IN ERYTHROCYTES OF LUNG CANCER PATIENTS
IN RELATION WITH STAGE OF THE DISEASE**¹*Krasnoyarsk state medical university,*²*Siberian federal university, Krasnoyarsk*³*Institute of medical problems of North, Krasnoyarsk***Abstract**

The aim of the study was to investigate level of markers of oxidative modification of proteins and glutathione system in erythrocytes at different stages of lung cancer. 116 patients with lung carcinoma were chosen for study. We measured proteins carbonyl derivatives, SH-groups of proteins, glutathione level, glutathione peroxidase and glutathione-s-transferase activity. The most increase of oxidative modification of proteins is happened on II and IV stage of the disease, however changes in glutathione system are similar at stages I-III, at IV stage glutathione level, glutathione peroxidase and glutathione-s-transferase activity are decreased.

Key words: lung cancer, oxidative stress, oxidative modification of proteins, glutathione system.

Введение

Рак легкого занимает одно из первых мест по распространенности среди злокачественных новообразований [2; 8; 10]. Как правило, местные проявления опухоли выражены достаточно слабо, особенно на начальных стадиях, что сильно затрудняет раннюю диагностику и борьбу с этим заболеванием. Соответственно, большое значение имеют вопросы о том, какие системные изменения в организме вызывает возникающая опухоль. Одними из первых происходят изменения редокс-статуса организма, что приводит к окислительной модификации макромолекул и отражается на состоянии органов и тканей больного [4; 6; 8]. Окисление белковых молекул может сопровождаться их агрегацией или фрагментацией, изменением гидрофобности и чувствительности к протеолизу [4; 6]. Наиболее чувствительными к действию большинства активных форм кислорода являются тиоловые группы белков. Даже при сравнительно мягких условиях цистеино-

вые остатки образуют дисульфиды. Это единственные формы окислительной модификации белков, которые могут быть репарированы.

В восстановлении тиоловых групп белков, подвергшихся свободно-радикальному окислению участвуют тиоредоксин- и глутатион-зависимые защитные системы [11; 15]. Основываясь на этом, можно предположить, что механизм окисления-восстановления тиоловых групп служит для захвата свободных радикалов, защищая тем самым молекулу от необратимых изменений.

Тем не менее, относительно немного известно о характере изменений со стороны ферментативных систем, напрямую связанных с обменом глутатиона и тиоловых групп белков при злокачественных новообразованиях легких.

Цель исследования – выявить особенности редокс-зависимой модификации белков и состояния глутатионного звена антиоксидантной системы у больных раком легкого в зависимости от стадии заболевания.

Материалы и методы

На базе Красноярского краевого онкологического диспансера обследовано 116 больных мужского пола, страдавших немелкоклеточным раком легкого, в возрасте 35–70 лет (ср. 53,4±2,4 года). У 8 диагностирована I стадия, у 30 – II стадия, у 44 – III стадия, у 34 – IV стадия заболевания. Окончательный диагноз устанавливался после оперативного вмешательства и гистологического исследования образцов опухоли врачами онкологического диспансера. В качестве контрольной группы были обследованы 35 здоровых доноров аналогичного возраста. Работу проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан».

Кровь забиралась из локтевой вены в гепаринизированные пробирки, утром, натощак, на следующий день после поступления больного в стационар. Эритроциты отделялись центрифугированием, после чего в них проводилось определение уровня карбонильных производных, тиоловых групп белков, восстановленного глутатиона, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы.

Об уровне КПБ судили по реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов [12]. Оптическую плотность образовавшихся производных динитрофенилгидразонов регистрировали спектрофотометрически при различных длинах волн: 356 нм – алифатические кетодинитрофенилгидразоны нейтрального характера; 370 нм – алифатические альдегиддинитрофенилгидразоны нейтрального характера [3]. Метод определения количества свободных тиоловых групп в белках основан на взаимодействии SH-групп с ДТНБК. Интенсивность окраски регистрировали спектрофотометрически при λ 412 нм. Для определения быстореагирующих SH-групп оптическую плотность пробы измеряли через две мин после начала реакции. Для определения медленно реагирующих SH-групп измерение оптической плотности производили через каждые 5 мин до тех пор, пока ее значение не становилось постоянным. Для выявления замаскированных SH-групп готовили пробу, в состав которой также входил 8 М р-р мочевины [1].

Определение количества восстановленного GSH основано на взаимодействии депротенинированного субстрата GSH с ДТНБК с образованием окрашенного дисульфида. Интенсивность окраски регистрировали при λ 412 нм. [7]. Активность глутатионпероксидазы определяли по скорости окисления глутатиона в присутствии пероксида водорода. Концентрацию глутатиона до и после инкубации определяли спектрофотометрически. Каталазную и псевдопероксидазную активность глутатионпероксидазы подавляли азидом натрия [13]. Активность глутатион-S-трансферазы определяли по скорости образования глутатион-S-конъюгатов между GSH и 1-хлор-2,4-динитробензолом. Увеличение концентрации конъюгатов регистрировали при длине волны 340 нм [9]. Содержание гемоглобина в эритроцитах определяли цианметгемоглобиновым методом [5].

Для всех данных определяли медиану (Me) и интерквартильный разброс в виде подсчета 25-(C₂₅) и 75-процентилей (C₇₅). Достоверность различий между группами оценивалась при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни.

Статистический анализ осуществлялся с помощью пакетов прикладных программ Statistica версия 7,0 (StatSoftInc., 2004).

Результаты и обсуждение

Динамика изменения уровня карбонильных производных белков в эритроцитах приведена в табл. 1. На II стадии заболевания в эритроцитах происходит увеличение содержания альдегидных форм КПБ на 119 %, на III стадии их уровень выше контрольных значений на 105 %, а на IV стадии падает до уровня контрольной группы.

Уровень кетонных форм КПБ на II стадии значительно возрастает, а затем на III стадии резко падает и на IV снова увеличивается. На II стадии он увеличивается на 380 %, на III – на 37 % и на IV стадии – на 197 %.

Содержание быстореагирующих SH-групп в эритроцитах на первой стадии выше на 19 %, на второй – 21 %, на третьей – 18 %, на четвертой – 33 % в сравнении с таковыми лиц контрольной группы. Содержание медленно реагирующих тиоловых групп белков в эритроцитах на I, II и III стадии ниже по сравнению с контролем на 28; 9; 13 % соответственно, на IV стадии содержание SH-групп выше на 16 %. Содержание замаскированных тиоловых групп в плазме в сравнении с контролем выше на 4 % на I стадии, на 14; 26; 2 3% на II, III и IV стадиях соответственно (табл. 2).

Уровень суммарных тиоловых групп существенно возрастает на II и IV стадиях рака легкого, на I и III стадиях значимых отличий от контроля не наблюдается (рис. 1).

Содержание восстановленного глутатиона на I стадии рака легкого ниже контроля на 34 %, на II стадии существенно возрастает и становится выше нормальных показателей на 40 %, на III стадии снова снижается, достигая контрольных значений, и на IV стадии становится ниже нормы на 42 % (рис. 2.)

Изменения активности глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы имеют схожую динамику, сначала происходит увеличение активности фермента от I ко II стадии, затем она постепенно снижается.

Но при этом активность глутатионпероксидазы в эритроцитах больных раком легкого все время выше контроля, в то время как активность глутатион-S-трансферазы снижена (рис. 3 и 4.)

Таким образом, в результате проведенного исследования было установлено, что динамика изменения уровня тиоловых групп белков в эритроцитах больных совпадает с таковой у карбонильных производных, что свидетельствует о единых механизмах окислительной модификации белков, в то же время характер изменений глутатионного звена антиоксидантной системы совпадает только на первых трех стадиях рака легкого.

Вероятно, в эти периоды развития заболевания глутатионовая система играет важную роль в поддержании уровня восстановленных тиоловых групп белков. На IV стадии изменения показателей редокс-зависимой модификации белков и глутатионного звена антиоксидантной системы разнонаправлены.

Повышение уровня сульфгидрильных групп белков может происходить в результате увеличения активности тиоредоксиновой системы, что отмечается некоторыми исследователями при раке легкого [8; 10]. Поскольку тиоловые группы белков могут выполнять антиоксидантную функцию, повышение их уровня, вероятно, происходит с целью компенсации недостатка низкомолекулярных антиоксидантов [14].

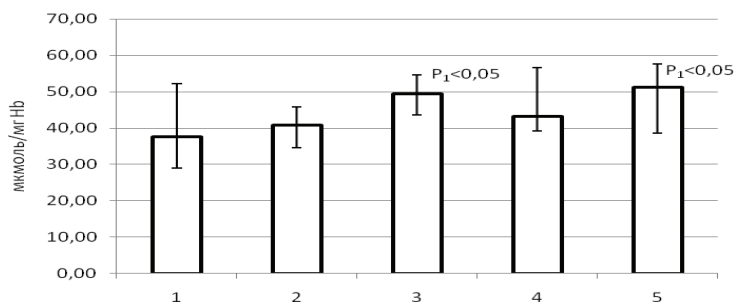


Рис. 1. Содержание суммарных тиоловых групп белков в эритроцитах в зависимости от стадии рака легкого:
1 – контрольная группа; 2 – больные раком легкого I стадии;
3 – больные раком легкого II стадии; 4 – больные раком легкого III стадии;
5 – больные раком легкого IV стадии.

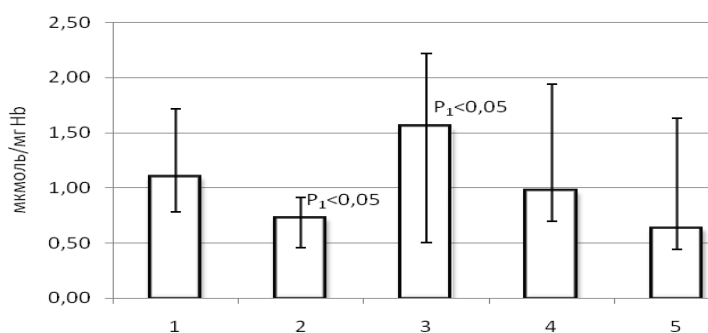


Рис. 2. Содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах в зависимости от стадии рака легкого:
1 – контрольная группа; 2 – больные раком легкого I стадии;
3 – больные раком легкого II стадии; 4 – больные раком легкого III стадии;
5 – больные раком легкого IV стадии.

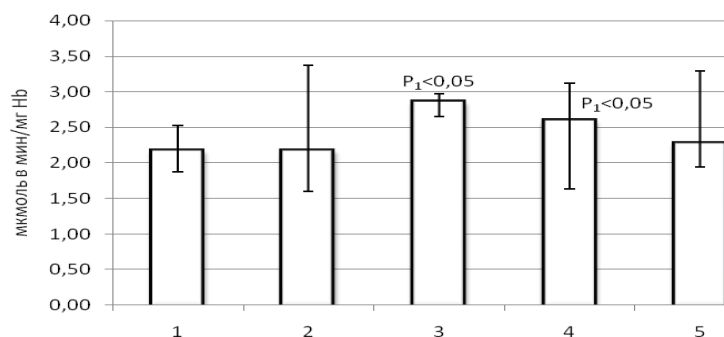


Рис. 3. Активность глутатионпероксидазы в эритроцитах в зависимости от стадии рака легкого:
1 – контрольная группа; 2 – больные раком легкого I стадии;
3 – больные раком легкого II стадии; 4 – больные раком легкого III стадии;
5 – больные раком легкого IV стадии.

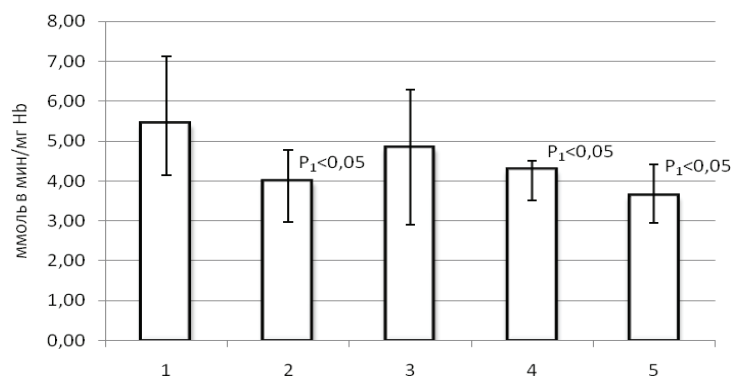


Рис. 4. Активность глутатион-S-трансферазы в эритроцитах в зависимости от стадии рака легкого:
1 – контрольная группа; 2 – больные раком легкого I стадии;
3 – больные раком легкого II стадии; 4 – больные раком легкого III стадии;
5 – больные раком легкого IV стадии.

Таблица 1

Содержание карбонильных производных белков в эритроцитах в зависимости от стадии рака легкого, у.е./г Hb (Me (C₂₅; C₇₅))

Стадия	N	Карбонильные производные белков	
		Альдегидные формы	Кетонные формы
Контроль	35	2,65 (1,69; 4,39)	1,84 (1,39; 2,95)
II	14	5,78 (2,22; 8,55)*	8,84 (5,62; 11,23)*
III	26	5,43 (2,03; 6,31)*	2,53 (1,50; 3,56)**
IV	20	2,73 (2,01; 9,13)	5,47 (2,93; 7,99)****

*p<0,05 по сравнению с контролем;
 **p<0,05 по сравнению со II стадией;
 ***p<0,05 по сравнению с III стадией

Таблица 2

Содержание тиоловых групп белков в эритроцитах в зависимости от стадии рака легкого, мкмоль/мг Hb (Me (C₂₅; C₇₅))

Стадия	N	Тиоловые группы		
		Быстрореагирующие	Медленнореагирующие	Замаскированные
Контроль	35	16,79(11,78; 21,23)	7,08(3,85; 9,91)	12,82(10,14; 19,28)
I	8	19,98(17,50; 22,15)	5,12(3,97; 7,79)	13,35(9,13; 17,43)
II	30	20,31(16,70; 25,58)	6,46(4,57; 12,73)	14,58(12,02; 23,28)
III	44	19,77(16,52; 27,46)	6,19(4,91; 11,79)	16,17(11,30; 18,95)
IV	34	22,31(12,50; 26,90)	8,19(5,98; 12,18)	15,83(13,54; 17,54)

Выводы

Таким образом, характер изменений окислительной модификации белков и глутатионowego звена антиоксидантной системы совпадает на первых трех стадиях рака легкого, что говорит о влиянии системы глутатиона на интенсивность окислительной модификации белков и восстановление тиоловых групп.

На IV стадии изменения разнонаправлены – происходит угнетение глутатион-зависимых механизмов и усиление окислительной модификации белков, что, вероятно, может являться одним из механизмов компенсации антиоксидантных свойств эритроцитов.

Литература

1. Вережкина И.В., Точилкин А.И., Попова Н.А. Колориметрический метод определения SH-групп и –S-S-связей в белках при помощи 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты. – Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 223–31.
2. Долгих В.Т. Опухолевый рост. – М.: Феникс, 2007. – 160 с.
3. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А. и др. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Вопр. мед. химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24–6.
4. Дубинина Е.Е., Пустыгина А.В. Свободнорадикальные процессы при старении, нейродегенеративных заболеваниях и других патологических состояниях // Биомедицинская химия. – 2007. – Т. 53, № 4. – С. 351–72.
5. Меньшиков В.В. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. – М.: Медицина, 1987. – 460 с.
6. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и др. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.
7. Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. – Grune&Stration, Orlando, 1990. – P. 131–4.
8. Esme H., Sezer M., et al. High levels of oxidative stress in patients with advanced lung cancer // Respirology. – 2008. – 13(1). – P. 112–6.
9. Habig W.H., Pabst M.J., Jacoby W.B. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. – 1974. – 249(22). – P. 7130–9.
10. Hernandez-Hernandez A., Rodriguez M.C., Lopes-Revuelta A. et al. Alteration in erythrocyte membrane protein composition in advanced non-small cell lung cancer // Blood Cells, Molecules, and Diseases. – 2006. – 36. – P. 355–63.
11. Kemp M., Go Y., Jones D.P. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: A perspective on redox systems biology // Free Radical Biology & Medicine. – 2008. – 44. – P. 921–37.
12. Levine L.R., Williams J.A., Stadtman E.R. et al. Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins // Methods in enzymology. – 1994. – 233(37). – P. 346–57.
13. Paglia D.E., Valentine W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase // J. Clin. Lab. Med. – 1967. – 70. – P. 158–69.
14. Suma H.R., Prabhu K., Shennoy R.P. et al. Estimation of salivary protein thiols and total antioxidant power of saliva in brain tumor patients // Journal of Cancer Research and Therapeutics. – 2010. – 6(3). – P. 278–81.
15. Winterbourn C.C., Hampton M.B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling // Free Radical Biology & Medicine. – 2008. – 45. – P. 549–61.

Список сокращений

ДТНБК	–	5,5'-дитио-бис-2-нитробензойная кислота
КПБ	–	Карбонильные производные белки
GSH	–	восстановленный Глутатион

УДК 616.33-006.6-092.9]:547.281.1+549.215

*М.А. Сеньчукова, А.А. Стадников, Д.А. Боков***КАНЦЕРОГЕННЫЙ ЭФФЕКТ СМЕСИ ФОРМАЛЬДЕГИДА И ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА ПРИ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ВВЕДЕНИИ КРЫСАМ***ГБОУ ВПО Оренбургская государственная медицинская академия Росздрава, Оренбург***Контактная информация***Сеньчукова Марина Алексеевна, канд. мед. наук, доцент кафедры онкологии ОрГМА***адрес:** 460001, г. Оренбург, ул. Чкалова, д. 15, кв. 47; **тел.** +7(3532)33-33-14**e-mail:** masenchukova@yandex.ru

Статья поступила 12.10.2012, принята к печати 30.10.2012.

Резюме

Установлен канцерогенный эффект внутрижелудочного введения смеси формальдегида и перекиси водорода белым беспородным крысам. Каждые две нед., в 1 и 3 день, животным внутрижелудочно вводили по 1,0 мл смеси, состоящей из 0,4 %-ного раствора формальдегида и 0,4 %-ного раствора перекиси водорода в отношении 1 : 1 на протяжении 6 мес. Через 7,5 мес от начала эксперимента у всех оставшихся в живых животных (n=21) выявлены злокачественные опухоли желудка, локализованные в пределах слизистой оболочки с инвазией отдельных опухолевых клеток или их скоплений в мышечную и серозную оболочку органа и опухолевыми эмболами в лимфатических и кровеносных сосудах. В 3 (14,3 %) наблюдениях отмечены метастазы рака в регионарных лимфоузлах и в 6 (28,6 %) – диссеминация по серозной оболочке тонкой кишки. У 4 (19 %) животных зафиксированы опухоли легких. Полученные данные могут быть использованы для изучения МЖК.

Ключевые слова: рак желудка, крыса, формальдегид, перекись водорода.*Senchukova M.A., Stadnikov A.A., Bokov D.A.***CARCINOGENIC EFFECT OF A MIX OF FORMALDEHYDE AND PEROXIDE OF HYDROGEN BY INTRAGASTRIC ADMINISTRATION OF RAT***Orenburg state medical academy, Orenburg***Abstract**

The cancerogenic effect of a mix of formaldehyde and peroxide of hydrogen by the intragastric administration to white outbred rats is established. Each two weeks, in 1 and 3 day, during 6 months the animals entered the 1,0 ml of the mix containing 0,4% formaldehyde and 0,4% peroxide of hydrogen concerning 1:1. In 7,5 months from the beginning of experiment at all survived animals (n=21) are revealed the malignant tumours of a stomach localized within the gastric mucosa with invasion of separate tumoral cells or their congestions in a muscularis propria and serosa, lymphatic and vascular invasion. In 3 (14,3%) cases are noted metastasises in regional lymph nodes and in 6 (28,6%) cases – dissemination on a peritoneum of a small intestine. At 4 (19%) animals are revealed tumours of lungs. Obtained data can be used for studying MGC.

Key words: gastric cancer, rat, formaldehyde, peroxide of hydrogen.**Введение**

В настоящее время получены данные, свидетельствующие о том, что ФА обладает цитотоксическим и канцерогенным эффектами [10; 12].

В эксперименте на крысах с длительным введением ФА с питьевой водой (в течение 2 лет) показана его способность индуцировать злокачественные лимфомы и опухоли желудочно-кишечного тракта [12]. Большинство исследователей связывают канцерогенные эффекты ФА с его выраженными генотоксическими свойствами, а именно, с его способностью образовывать белковые сшивки ДНК [11; 13]. Что же касается ПВ, в ряде работ установлено, что она также обладает генотоксическими свойствами [5; 6] и, кроме того, способна стимулировать процессы неоангиогенеза [8]. Совместное применение ФА и ПВ приводило к усилению генотоксических свойств ФА, однако, данное исследование проводилось для изучения механизмов атеросклероза [9].

Мы не встретили работ, где ПВ изучалась бы экспериментально, как фактор, способный потенцировать действие известных канцерогенов, хотя роль эндогенных продуктов перекисного окисления

в канцерогенезе достаточно хорошо известна [4; 7]. Все выше сказанное послужило основанием для проведения настоящего исследования.

Цель – оценить канцерогенные свойства смеси ФА и ПВ и возможность ее использования для индукции злокачественных опухолей, в частности рака желудка.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 35 белых беспородных крысах самцах массой 180 – 250 г (30 подопытные, а 5 – контрольные). Содержание животных и эксперименты осуществляли согласно «Правилам проведения работ с использованием лабораторных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР).

Животным каждые две недели, в 1 и 3 день, внутрижелудочно вводили по 1,0 мл смеси, состоящей из 0,4 %-ного раствора формальдегида и 0,4 %-ного р-ра раствора перекиси водорода в отношении 1:1 на протяжении 6 месяцев. Смесь готовили при комнатной температуре и вводили в течение 15 минут от момента смешивания растворов. Контролем служили 5 intactных крыс, находив-

шихся на обычном пищевом и водном режиме. Через 6 мес. от начала эксперимента, после наркотизации парами эфира, забиты первые 5 крыс, остальные (21) – через 7,5 мес. Желудки крыс и иные органы, имеющие признаки патологических изменений, изучали гистологически. Парафиновые срезы толщиной 3–4 мкм окрашивали гематоксилином Майера и эозином и иммуногистохимическим методом (ИГХ) с использованием антител к панцитокератину AE1/AE3 («DAKO», Дания). Препараты изучали с помощью микроскопа Optika B-350 (Optika, Италия) с использованием видеокамеры Digital Camera for Microscope DCM500. Гистологическую структуру опухоли устанавливали в соответствии с Международной гистологической классификацией опухолей пищевода и желудка [14].

Результаты и обсуждение

Введение смеси ФА и ПВ подопытным животным сопровождалось явлениями интоксикации, которые были наиболее выражены в первые сутки после введения смеси.

У подопытных животных наблюдалась заторможенность, вялость, редко – одышка (возможно за счет того, что при введении часть смеси попадала в дыхательные пути), отек мошонки. 4 крысы погибли на 4–6 сутки после 2 введения смеси ФА и ПВ от явлений острой интоксикации. У погибших животных наблюдались отек легких, застойные изменения в печени, выраженный отек слизистой желудка. Смертность составила 13,3 %. По мере увеличения числа введений отмечалась адаптация животных к вводимым ксенобиотикам со снижением выраженности побочных эффектов.

Первые опухоли зафиксированы через 6 мес от начала эксперимента (у 4 из 5 животных). В одном случае опухоль представляла собой экзофитное образование около 0,4 мм в диаметре, в других – очаговые уплотнения слизистой оболочки (0,5–1,0 см), иногда с микроэрозиями на ее поверхности. Изменения носили одиночный характер и локализовались преимущественно в пределах слизистой оболочки пилорического отдела желудка или на границе пилорического и фундального отделов. Гистологическая картина соответствовала высоко и умеренно (в 1 случае) дифференцированной аденокарциноме желудка на фоне высокой степени интраэпителиальной неоплазии. В измененных участках выявлялись атипичные железы, неправильной формы, часто с кистозными расширениями. Кубические или уплощенные клетки, выстилающие стенки таких желез, отличались выраженной атипией: анизоцитозом, анизокарицитозом, полихромазией ядер, патологическими митозами. В одном случае наблюдалась инвазия опухоли в подслизистую основу желудка.

Что касается слизистой оболочки преджелудка, она выглядела несколько истонченной, складки сглажены. В области перехода преджелудка в тело во всех случаях регистрировались явления дисплазии плоского ороговевающего эпителия. Это проявлялось нарушением архитектоники эпителиального пласта, полярности эпителиальных клеток, их полиморфизмом. Ядра клеток базального слоя гиперхромны, много митозов. Довольно часто в этой области встречались «эпителиальные жемчужины», иногда наблюдался «рост» эпителиального пласта в толщу подслизистой основы слизистой оболочки желудка. На других участках слизистой преджелудка отмечалось истончение пласта по-

кровного эпителия, с признаками инволютивно-дегенеративных изменений в нем.

Через 7,5 мес. злокачественные опухоли в теле и пилорическом отделе желудка зафиксированы у всех животных. Обычно наблюдалось несколько (до 2–3) инфильтрированных участков слизистой оболочки желудка с ригидными складками размером от 0,7×1,0 см до 1,5×3,0 см. У 5 из 21 крысы (23,8 %) обнаружены схожие образования и в слизистой 12-перстной кишки. При микроскопическом исследовании большинство новообразований локализовались в пределах слизистой оболочки желудка. У 17 из 21 (80,9 %) животных были выявлены новообразования, соответствующие перстневидноклеточному раку (рис. 1–2; см. вклейку), у 14 (66,6 %) – очаги высокодифференцированной тубулярной аденокарциномы (рис. 3), у 5 (23,8 %) – умеренно дифференцированной аденокарциномы (рис. 4). В 5 наблюдениях отмечено разрастание опухоли в подслизистой основе органа (рис. 5).

Несмотря на то, что опухоли локализовались в пределах слизистой оболочки и подслизистой основы желудка, у всех животных к концу эксперимента кровеносных и лимфатических сосудах подслизистой основы наблюдались опухолевые эмболы (рис. 6). Тяжи и скопления опухолевых клеток отмечены также в мышечной (рис. 7) и серозной оболочке органа. В 3 случаях в плотных, увеличенных до 0,5–1,0 см регионарных лимфатических узлах большого сальника выявлены метастазы железистого рака, что подтверждалось экспрессией панцитокератина в цитоплазме опухолевых клеток, отличающихся выраженным клеточным и ядерным полиморфизмом (рис. 8).

В 6 наблюдениях (28,6 %) по серозной оболочке тонкой кишки отмечены белесоватые образования 1–2 мм в диаметре. Микроскопически они были представлены опухолевыми инфильтратами, поражающими всю толщу стенки органа. Большая часть клеток, образующих описанные структуры, были с небольшими гиперхромными ядрами округлой, овальной и неправильной формы, с тонким ободком цитоплазмы. Реакция на панцитокератин в них отсутствовала или была слабо позитивной. Другие клетки имели крупные светлые ядра, различных размеров и формы. Их цитоплазма отличалась более интенсивной реакцией к цитокератину (рис. 9). Указанные клетки нередко формировали мелкие полостные структуры. При диссеминации опухоли по серозной оболочке тонкой кишки во всех случаях наблюдались раковые комплексы в большом сальнике.

Следует отметить, что неопластические изменения развивались на фоне умеренной атрофии слизистой оболочки желудка (в основном пилорического отдела). На участках, расположенных рядом с опухолью отмечались выраженная дисплазия желудочного эпителия и появление в слизистой желудка очаговых лейкоцитарных инфильтратов. В подслизистой основе желудка на участках, расположенных рядом с опухолью, зафиксировано формирование сосудов капиллярного типа, образованных одним слоем эндотелиальных клеток. Клинические исследования свидетельствуют о том, что сосуды подобного типа могут отражать инвазивный и метастатический потенциал злокачественных опухолей [1; 2].

У 4 животных (19 %) выявлены опухоли в легких, которые были представлены белесоватыми уплотнениями от 0,5 до 1,0 см в диаметре, неправильной формы и с нечеткими контурами. При гис-

тологическом исследовании патологические образования были представлены железистыми структурами, неправильной, причудливой формы, часто с сосочковыми разрастаниями в их просвете, с большим количеством митозов, в том числе и патологических, клеточным и ядерным полиморфизмом (рис. 10). В окружающей ткани опухолевые клетки образовывали обширные диффузные инфильтраты со слабо выраженной стромой, неоднородные по клеточному составу. Некоторые инфильтраты состояли в основном из обширных скоплений мелких, лимфоцитоподобных клеток, с гиперхромными ядрами и очень тонким ободком цитоплазмы. Другие – из полиморфных клеток с эозинофильной цитоплазмой и ядрами округлой формы, различной величины и интенсивности окраски, которые располагались либо центрально, либо по периферии клетки, выходя за контуры ее оболочки. В окружающих тканях отмечался выраженный отек, венозное полнокровие, обширные диффузные и очаговые лейкоцитарные инфильтраты, местами обширные кровоизлияния. Наблюдаемые изменения могут соответствовать как метастатическому поражению легких, так и первичным опухолям, которые могли возникнуть в результате попадания смеси в дыхательные пути.

У двух крыс в брыжейке тонкой кишки выявлены увеличенные до 1 см плотные лимфоузлы. При микроскопическом исследовании, на фоне реактивной гиперплазии в корковом слое отмечались единичные фолликулоподобные структуры, не имеющие четких границ, инфильтрирующие мозговой слой и оболочку лимфатического узла. Опухолевые клетки отличались выраженным ядерным полиморфизмом, встречались клетки с гигантскими ядрами, с ядрами неправильной формы, многоядерные клетки. В синусах большое количество плазматических клеток и макрофагов. Такая картина соответствовала злокачественным лимфомам. В других исследованных брыжеечных лимфоузлах наблюдались явления реактивного лимфаденита.

Кроме описанных изменений у подопытных животных также наблюдались выраженные дистрофические и дегенеративные изменения в печени и семенниках, обусловленные хронической интоксикацией. В печени эти изменения выражались расширением и полнокровием вен печеночных долек и синусоидных капилляров, скоплением эритроцитов в просвете сосудов с образованием микротромбов.

В сосудах центральных отделов долек часто отмечалось краевое стояние лейкоцитов и лейкодиapedез. В перилобулярных отделах печеночных долек размеры гепатоцитов уменьшены, наблюдался пикноз ядер клеток, редукция цитоплазмы. Цитоплазма гепатоцитов зерниста.

На поздних сроках эксперимента в ткани печени появлялись очаговые кровоизлияния, с выраженной дистрофией и некрозом гепатоцитов.

В семенниках крыс развивался отек стромы и инволютивные изменения эндокриноцитов (клеток Лейдига). На поздних сроках эксперимента наблюдалась гиалинизация интерстициальной ткани органа. В извитых семенных канальцах отмечалась деструкция сперматогенного эпителия, заполнение канальцев некротизированным клеточным детритом, нарушение целостности собственной оболочки семенных канальцев.

Заключение

Проведенное исследование установило, что смесь ФА и ПВ обладает высокой канцерогенной активностью. С химической точки зрения эта смесь обладает рядом особенностей.

Так, Л.В. Серебренниковым и А.В. Головкиным при изучении продуктов реакции ФА и ПВ методом спектрального анализа [3] было отмечено, что исходные продукты и их комплексы ($\text{CH}_2\text{O} \dots \text{H}_2\text{O}_2$) довольно продолжительное время регистрируются в исследуемой смеси. Независимо от соотношения смешиваемых веществ (1 : 1; 1 : 2; 2 : 1) промежуточным и довольно стойким продуктом их реакции является перекисная молекула $\text{H}_2\text{C}(\text{OH})\text{OON}$, которая в дальнейшем может разлагаться на муравьиную кислоту, воду и диоксид углерода.

По сравнению с исследованием M. Soffritti et al. [12], применение с ФА вместе с ПВ способствовало не только значительному увеличению числа животных с опухолями (12 и 100 % соответственно), сокращению времени введения канцерогена (104 нед. и 26 нед. соответственно), но и стимулировало метастатическую активность индуцированных опухолей желудка.

Результаты исследования могут быть использованы для изучения механизмов желудочного канцерогенеза, в частности опухолевого ангиогенеза и метастазирования.

Литература

1. Бондарь Г.В., Шлопов В.Г., Белецкий Г.Л. и др. Морфология и морфогенез сосудистого русла культивируемой шейки матки после надвлагалищной ампутации по поводу новообразований тела матки и придатков // Архив клинической и экспериментальной медицины. – 1999. – Т. 8, № 1. – С. 8–12.
2. Сеньчукова М.А., Стадников А.А., Шевлюк Н.Н., Боков Д.А. Морфологическая характеристика сосудов подслизистой оболочки желудка на участках, прилежащих к опухоли, у больных раком желудка // Вопросы онкологии. – 2010. – Т. 56, № 2. – С. 40–1.
3. Серебренников Л.В., Головкин А.В. Реакция формальдегида с пероксидом водорода. ИК – спектры в матрицах из ксенона и расчет интермедиатов и переходных состояний // Вестн. Моск. Ун-та. Сер.2. Химия. – 2005. – Т. 46, № 6. – 370–7.
4. Якубовская Р.И., Сергеева Т.В., Немцова Е.Р., Безбородова О.А. Антиоксиданты – место и роль в онкологии // Российский онкологический журнал. – 2003. – № 5. – С. 48–53.
5. Andersson M., Stenqvist P., Hellman B. Interindividual differences in initial DNA repair capacity when evaluating H₂O₂-induced DNA damage in extended-term cultures of human lymphocytes using the comet assay // Cell Biol Toxicol. – 2007. – 23(6). – P. 401–11.
6. Horvathov E., Slamenov D., Marslkov L. et al. Effects of borneol on the level of DNA damage induced in primary rat hepatocytes and testicular cells by hydrogen peroxide // Food Chem Toxicol. – 2009. – 47(6). – P. 1318–23.

7. *Ishikawa S., Tamaki S., Ohata M. et al.* Heme induces DNA damage and hyperproliferation of colonic epithelial cells via hydrogen peroxide produced by heme oxygenase: a possible mechanism of heme-induced colon cancer // *Mol Nutr Food Res.* – 2010. – 54(8). – P. 1182–91.
8. *Kim Y.M., Kim K.E., Koh G.Y. et al.* Hydrogen peroxide produced by angiopoietin-1 mediates angiogenesis // *Cancer Res.* – 2006. – 66(12). – P. 6167–74.
9. *Lin Z., Luo W., Li H., Zhang Y.* The effect of endogenous formaldehyde on the rat aorta endothelial cells // *Toxicol Lett.* – 2005. – 159(2). – P. 134–43.
10. *McGregor D., Bolt H., Cogliano V., Richter-Reichhelm H.B.* Formaldehyde and glutaraldehyde and nasal cytotoxicity: case study within the context of the 2006 IPCS Human Framework for the Analysis of a cancer mode of action for humans // *Crit Rev Toxicol.* – 2006. – 36(10). – P. 821–35.
11. *Neuss S., Speit G.* Further characterization of the genotoxicity of formaldehyde in vitro by the sister chromatid exchange test and co-cultivation experiments // *Mutagenesis.* – 2008. – 23(5). – P. 355–7.
12. *Soffritti M., Belpoggi F., Lambertin L. et al.* Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of formaldehyde and acetaldehyde in rats // *Ann N Y Acad Sci.* – 2002. – 982. – P. 87–105.
13. *Speit G., Schmid O., Neuss S., Schütz P.* Genotoxic effects of formaldehyde in the human lung cell line A549 and in primary human nasal epithelial cells // *Environ Mol Mutagen.* – 2008. – 49(4). – P. 300–7.
14. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetic of Tumours of the Digestive System. The WHO Classification of Tumours of the Digestive System. - Lyon, France, November 6-9, 1999. – 253 p.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 618.19-006.6-076:615.32

*А.П. Дмитренко, Б.М. Зайдинер***ВЛИЯНИЕ ЭКСЦИЗИОННОЙ БИОПСИИ
НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ***ГБУ РО «Онкодиспансер», Ростов-на-Дону***Контактная информация***Дмитренко Алексей Петрович, канд. мед. наук, врач***адрес:** 344006, Ростов-на-Дону, ул. Соколова, 9; **тел.** +7(8632)29-64-85, +7(928)229-64-85**e-mail:** Alex_Dmitrenko@mail.ru

Статья поступила 25.01.2013, принята к печати 01.02.2013.

Резюме

Представления о влиянии ЭБ на выживаемость больных РМЖ остаются противоречивыми. Материалом для исследования послужила выборка больных РМЖ I–II стадии (n=1414), наблюдавшихся в период 1990–1999 гг. Выделено две группы: группа №1 – больные, перенесшие РМЭ в день ЭБ (n=1185), и группа №2 – больные, перенесшие отсроченную РМЭ (n=229). Изучено влияние временного интервала между ЭБ и РМЭ на десятилетнюю ОВ и БРВ. Сравнительный анализ показал, что выживаемость больных, перенесших РМЭ в день ЭБ (группа №1), была ниже, чем выживаемость больных с отсроченной РМЭ (группа №2). Было установлено, что влияние отсроченной РМЭ, определено состоянием регионарных лимфоузлов. При отсутствии метастазов в регионарных лимфоузлах наблюдалась достоверно более высокая выживаемость больных, перенесших ЭБ с отсроченной РМЭ. Таким образом, влияние ЭБ на выживаемость больных РМЖ I–II стадии, при условии отсроченности РМЭ от 1 до 15 дней, сопряжено с состоянием регионарных лимфоузлов.

Ключевые слова: биотерапия, рак молочной железы, биопсия.*A.P. Dmitrenko, B.M. Zajdiner***INFLUENCE OPEN SURGICAL BIOPSY
ON SURVIVAL RATE SICK OF THE BREAST CANCER***State Budgetary Establishment of the Rostov Region «Oncodispensary», Rostov-on-Don***Abstract**

Representations about influence OSB on survival rate sick of a BC remain discordant. As a stuff for research sample of patients BC I–II of a stage (n=1414) has served, observed in 1990–1999. Is secured two groups: group №1 – the patients who have tolerated a RM in day OSB (n=1185), and group №2 – the patients who have tolerated delayed RM (n=229). Time interval influence between OSB and BC on the ten years' OS and DFS rate is studied. Relative analysis has shown, that the survival rate of the patients who have tolerated RM in day OSB (group №1), was more low, than survival rate of patients with delayed RM (group №2). Influence delayed RM has been established, that, defined by a state regional lymphonoduses. In the absence of metastasises in regional lymphonoduses higher survival rate of the patients who have tolerated OSB with delayed RM was observed authentically. Thus, influence OSB on survival rate of patients BC I–II of a stage, under a condition delayed RM from 1 till 15 days, is interfaced to a state regional lymphonoduses.

Key words: biotherapy, breast cancer, biopsy.**Введение**

Современное лечение РМЖ на предварительном этапе предусматривает уверенную морфологическую верификацию опухоли. Выбор способа биопсии в каждом конкретном случае определён клинической ситуацией и техническими возможностями онколога.

Однако существуют опасения, связанные с диссеминацией опухолевых клеток в результате нарушения целостности опухолевого образования. Эволюция такого рода суждений привела к появлению гипотезы, что риск диссеминации рака в большей мере связан с ЭБ и в меньшей мере – с тонкоигольной биопсией. Согласно базовым клиническим рекомендациям радикальное хирургическое лечение должно быть максимально приближено к ЭБ. Проведенный нами анализ мировой литературы показал, что биологическое значение различных видов биопсии всё же не ясно, а суждения о её влиянии на выживаемость больных РМЖ остаются противоречивыми [1; 3; 4].

Материалы и методы

Объектом исследования послужили больные РМЖ I–II стадии, наблюдавшиеся в онкодиспансере г. Ростова-на-Дону в период 1990–1999 гг. Выборка представлена больными, перенесшими ЭБ (n=1414). ЭБ опухоли проводилась в объеме секторальной резекции молочной железы. Операционный материал направлялся на срочное гистологическое исследование. В дальнейшем, морфологическая верификация либо была получена сразу и тогда РМЭ выполнялась в день ЭБ, либо материал подвергался парафиновой проводке и РМЭ выполнялась несколько отсрочено. В последнем случае медиана между ЭБ и РМЭ составила 8 (4,0_{25%}–14,0_{75%}) дней. Таким образом, в выборке больных, перенесших ЭБ, выделено две группы: группа №1 – больные, перенесшие РМЭ в день ЭБ (n=1185), и группа №2 – больные, перенесшие отсроченную РМЭ (n=229). Проведена оценка влияния эксцизионной биопсий на десятилетнюю ОВ и БРВ. Сравнимые группы по возрастному составу и опухолевой распространен-

ности были сопоставимы. Наличие рака у всех больных подтверждено результатами гистологического анализа операционного материала. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы «Статистика 8.0».

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ показал, что выживаемость больных, перенесших РМЭ в день ЭБ (группа №1), была ниже, чем выживаемость больных с отсроченной РМЭ (группа №2). Десятилетняя ОБ больных группы №1 составила – $72,0 \pm 2,0\%$, группы №2 – $87,9 \pm 2,7\%$, различия достоверны ($p=0,0071$). Десятилетняя БРВ больных группы №1 составила – $71,6 \pm 1,8\%$, группы №2 – $86,1 \pm 2,8\%$, различия достоверны ($p=0,00003$).

Анализ выживаемости продолжен с учетом состояния регионарных ЛУ. При отсутствии метастазов в регионарных ЛУ выживаемость больных группы №1 была так же ниже, чем выживаемость больных группы №2. Десятилетняя ОБ больных группы №1 составила – $76,8 \pm 2,2\%$, группы №2 – $91,9 \pm 2,7\%$, различия достоверны ($p=0,0056$). Десятилетняя БРВ больных группы №1 составила – $75,7 \pm 2,3\%$, группы №2 – $89,2 \pm 3,4\%$, различия достоверны ($p=0,0016$). При наличии метастазов в регионарных ЛУ различия ОБ сглаживались: десятилетняя ОБ больных группы №1 составила $60,7 \pm 2,7\%$, группы №2 – $68,5 \pm 9,0\%$, различия не достоверны ($p=0,39$). Десятилетняя БРВ больных группы №1 составила – $58,8 \pm 3,8\%$, группы №2 – $68,1 \pm 8,7\%$, различия не достоверны ($p=0,21$).

Таким образом, биологическое значение ЭБ, а именно влияние на выживаемость больных РМЖ, сопряжено с состоянием регионарных ЛУ. При отсутствии метастазов в ЛУ наблюдалась достоверно более высокая выживаемость больных, перенесших ЭБ с отсроченной РМЭ. При наличии метастазов в ЛУ влияние ЭБ на выживаемость больных РМЖ было не достоверным. Результаты анализа существенно трансформировали наши представления о влиянии ЭБ выживаемость больных РМЖ. Ситуация при которой РМЭ выполнялась спустя несколько дней после ЭБ, считавшаяся ранее прогностически неблагоприятной, фактически приводила к повышению выживаемости. Ключевым условием, определяющим влияние ЭБ с отсроченной РМЭ, являлось отсутствие метастазов в регионарных ЛУ. Методика ЭБ предусматривает удаление опухоли в блоке с окружающими тканями, т.е. опухоль остается фактически неповрежденной.

Литература

1. Bertario L., Reduzzi D., Piromalli D. et al. Outpatient biopsy of breast cancer. Influence on survival // Ann Surg. – 1985. – 201(1). – P. 64–7.
2. Carter B.A., Jensen R.A., Simpson J.F. et al. Benign transport of breast epithelium into axillary lymph nodes after biopsy // Am J Clin Pathol. – 2000. – 113. – P. 259–65.
3. Hansen N.M., Ye X., Grube B.J., Giuliano A.E. Manipulation of the primary breast tumor and the incidence of sentinel node metastases from invasive breast cancer // Arch Surg. – 2004. – 139(6). – P. 634–40.
4. Kinoshita S., Uchida K., Kyoda S. et al. Impact of fine-needle aspiration on long-term survival rate and axillary lymph node micrometastasis in patients with early breast cancer // Breast J. – 2007. – 13(2). – P. 216–17.
5. Loughran C.F., Keeling C.R. Seeding of tumour cells following breast biopsy: a literature review // Br. J. Radiol. – 2011. – 84 – P. 869–74.

Список сокращений

БРВ – безрецидивная выживаемость; ОБ – общая выживаемость; РМЭ – радикальная мастэктомия; РМЖ – рак молочной железы; ЭБ – эксцизионная биопсия.

BC – breast cancer; OSB – open surgical biopsy; RM – radical mastectomy; OS – overall.

Из всех видов биопсии именно при ЭБ происходит максимальный выброс клеток, их обломков и фрагментов тканей в лимфатическое русло. Биологическое значение этого перемещения пока достоверно не установлено [4; 5]. Это может быть движением биологически инертного материала [2], но может быть и событием, способным активировать иммунорегуляторные процессы. Основным местом, где проходят ключевые иммунорегуляторные процессы, конечно, являются регионарные ЛУ. Для реализации этих эффектов необходимо время. Таким образом, отсроченность лимфодиссекции и способствует реализации иммунных процессов. Возможно, в данном случае имеет место биотерапевтический эффект, вследствие которого выживаемость больных, перенесших ЭБ с отсроченной РМЭ достоверно выше, чем выживаемость больных, перенесших РМЭ в день ЭБ. Таким образом, по результатам нашего исследования мы считаем, что современное направление хирургического лечения РМЖ, предусматривающее сохранение регионарных ЛУ при условии отсутствия в них метастазов, включает в себе биотерапевтический потенциал и является перспективным. В настоящее время такие возможности предоставляет методика исследования сторожевого ЛУ. И ценность этой методики, на наш взгляд, не только в снижении частоты осложнений. Прежде всего, сохраняя рецепторное поле иммунной системы, мы тем самым способствуем мобилизации собственных ресурсов опухоленосителя. Отдаленные результаты такого подхода к хирургическому лечению РМЖ уже начинают публиковаться. Авторы констатируют, что при прочих равных условиях выживаемость больных, перенесших только биопсию сторожевого ЛУ, достоверно выше, чем выживаемость больных, перенесших аксиллярную лимфодиссекцию.

Выводы

1. Выполнение РМЭ в сроке до 15 дней после ЭБ не ухудшает выживаемость больных РМЖ I–II стадии.
2. Влияние эксцизионной биопсии на выживаемость больных РМЖ I–II стадии, при условии отсроченности РМЭ от 1 до 15 дней, сопряжено с состоянием регионарных лимфоузлов.
3. Эксцизионная биопсия РМЖ I–II стадии, при условии отсроченности РМЭ до 15 дней, повышает выживаемость больных с метастатически не пораженными регионарными лимфоузлами.

При ссылке на главу из книги, написанной коллективом авторов, указывают авторов главы и ее название, затем авторов или редакторов книги, название книги, номер издания (может отсутствовать), место издания, издательство (может отсутствовать), год и страницы, например:

Кэйи Д. Этические и правовые основы медицинской помощи. Берек Д., Адаши И., Хиллард П. (ред.). Гинекология по Эмилю Новаку: Пер. с англ. – М.: Практика, 2002. – С. 14-18.

При ссылке на журнал указывают авторов, затем название статьи, названию периодического издания или сборника предшествует символ // . После названия журнала указывается год, том, номер выпуска, первая и последняя страницы работы, например:

Поддубная И. В., Дёмина Е. А. Диагностика и определение распространенности (стадирование) неходжкинских лимфом // Практическая онкология. – 2004. – № 3. – С. 176–184.

При ссылке на сборник статей указывают авторов, затем название статьи, сборника, место издания, год, страницы, например:

Коненко Г. А. Решение уравнений движения однофазного вязкого закрученного потока в длинной трубе. Отопление и вентиляция. – Иркутск, 1994. – С. 34–36.

При ссылке на тезисы докладов указывают авторов, затем название тезисов конференции, страницы. При ссылке на диссертации или авторефераты указывают автора, затем название диссертации, место и дату написания, страницы. При этом используются следующие сокращения: Дис... канд. мед. наук, Дис... д-ра мед. наук, Авторефер. дис... канд. мед. наук, Авторефер. дис... д-ра мед. наук. Ссылки на интернет-документы следует оформлять так:

Официальные периодические издания: электронный путеводитель / Рос. нац. б-ка, Центр правовой информации. [СПб.], 2005 – 2007. URL: <http://www.nlr.ru/lawcenter/izd/index.html> (дата обращения: 18.01.2007).

Логинова Л.Г. Сущность результата дополнительного образования детей // Образование: исследовано в мире: междунар. науч. пед. интернет-журн. 21.10.03. URL: <http://www.oim.ru/reader.asp?nomer=366> (дата обращения: 17.04.07).

Рынок тренингов Новосибирска: своя игра [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://nsk.adme.ru/news/2006/07/03/2121.html>

В тексте рекомендуется использовать международные названия лекарственных средств, которые пишутся с маленькой буквы. Торговые названия препаратов пишутся с большой буквы.

В конце статьи должны стоять подписи всех авторов. На отдельном листе авторам следует указать почтовый адрес для переписки, включающий почтовый индекс, телефон(ы), факс и адрес электронной почты. Все статьи, поступившие в редакцию, подлежат рецензированию. Рецензенты для каждой статьи назначаются редакционной коллегией. Если рецензенты и редакторы предлагают исправить работу, то копия с таким предложением отправляется автору. Эта копия возвращается вместе с переработанным экземпляром, который представляется на бумаге и в электронном виде.

Редакция оставляет за собой право отклонить работу из-за несоответствия профилю и требованиям журнала, достоверности и объективности данных, наличия ошибок или неподкрепленных достоверными фактами деклараций, противоречащих современным научным представлениям и опыту.

Редакция журнала осуществляет научное и литературное редактирование статей, обязуется информировать авторов обо всех смысловых изменениях, возникающих при редактировании их работ (это не касается литературной правки).

Статьи, ранее опубликованные в других журналах или сборниках, не будут приняты к публикации.

*С уважением,
главный редактор А.Ю. Барышников*

К 60-летию Караулова Александра Викторовича

Доктор медицинских наук (1988), профессор (1991). Заслуженный деятель науки (1999). Член-корреспондент РАМН (2004). Специалист в области иммунобиологии.

Вся научная деятельность Александра Викторовича Караулова посвящена иммунологии. Он получил классическое иммунологическое образование, работал в ведущих иммунологических центрах, принимал деятельное участие в организации иммунологического сообщества в нашей стране. Он организовал одну из первых иммунологических лабораторий, иммунологическую клинику и кафедру в Первом МГМУ им. И.М.Сеченова, возглавил иммунологическое общество г. Москвы.

После окончания аспирантуры Всесоюзного Онкологического Научного Центра АМН СССР в 1979 году А.В. Караулов работал младшим, старшим научным сотрудником, с 1983 года – заведующий лабораторией иммунологии, а с 1986 года – отделения клинической иммунологии Института прикладной молекулярной биологии МЗ СССР, одновременно – научный руководитель ЦКБ IV ГУ при МЗ РСФСР. С 1988 года – заместитель директора Института иммунологии МЗ СССР, главный аллерголог-иммунолог III ГУ при МЗ СССР и ГМУ АН СССР, с 1990 года по 1993 год – директор Института биомедицинских исследований и терапии Всесоюзного научного центра молекулярной диагностики и лечения Минздрава СССР, работал в Институте Пастера в Париже, закончил Гарвардские курсы, являлся главным редактором международных журналов «Медикал Маркет» и «Практикующий врач». Одновременно с 1990 года – заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

А.В. Караулов является ведущим специалистом нашей страны в области иммунологии. Уже первые научные исследования А.В. Караулова выявили биологические характеристики различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток, что позволило создать и внедрить оригинальную методологию оценки состояния иммунной системы. В дальнейшем им получены новые данные о регуляции иммунных реакций в норме и при патологии человека, установлены клеточные и молекулярные механизмы вторичных иммунодефицитов, предложены новые методы иммунотерапии и иммунореабилитации иммунозависимых заболеваний.

Работы последнего десятилетия посвящены исследованию механизмов врожденного иммунитета при инфекционных, аллергических и иммунодефицитных заболеваниях, функционированию мукозального иммунитета респираторного и урогенитального тракта, изучению иммунорегуляторной роли растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы человека в норме и патологии, иммуномониторингу при применении иммуномодуляторов, дендритных вакцин и клеточной терапии с использованием регуляторных клеток. В этот же период своей активной научной деятельности А.В. Караулов, являясь научным руководителем лаборатории медицинской биотехнологии МНИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского и научным консультантом ряда ведущих медицинских центров, разрабатывает и внедряет ряд новых иммунобиологических и лекарственных препаратов. Совместно с коллективом единомышленников им также завершен цикл работ по патогенетическим механизмам хламидийной инфекции с расшифровкой генов возбудителей человека и обезьян и установлением взаимозависимости факторов патогенности хламидий и клинической выраженности инфекционного процесса.

На протяжении двадцати лет совместно с Департаментом здравоохранения г. Москвы А.В. Караулов с учениками проводит работу по совершенствованию диагностики и лечения больных первичными иммунодефицитами. Впервые в России создана система специализированной помощи взрослым больным первичными иммунодефицитами, которая включает раннюю клиническую диагностику, углубленное клинко-иммунологическое обследование, лечение и динамическое наблюдение этой группы больных.

Результаты своей работы А.В. Караулов постоянно представляет в лекциях и докладах на конгрессах и конференциях, они также опубликованы в виде утвержденных медицинских технологий, патентов, отчетов по грантам и более чем трехсот научных статьях в отечественных и зарубежных журналах.

А.В. Караулов проявил себя как активный ученый и педагог: он автор первых учебников, атласов и учебных пособий по клинической иммунологии и аллергологии, двадцати монографий и книг, консультант и научный руководитель 15 докторских и 28 кандидатских диссертаций. В РАМН он активно работает в составе комиссии по работе с молодыми учеными, в составе экспертного совета ВАК РФ проводит экспертную оценку диссертационных работ по иммунологии и аллергологии, возглавляет диссертационный Совет и научную школу по клинической иммунологии онкоиммунологии, отмеченную Советом по грантам Президента РФ и грантами РФФИ. В настоящее время является заместителем главного редактора «Российского биотерапевтического журнала», членом редколлегии ведущих иммунологических журналов («International Trends in Immunity», «Иммунология», «Российский журнал иммунологии», «Цитокины и воспаление», ЖМЭИ и др.)

А.В. Караулов – председатель комиссии здравоохранения Российской ассоциации содействия ООН, в качестве советника и эксперта – член Российских делегаций на Исполкомах, Генассамблеях, комитетах ВОЗ, активный участник международных форумов и съездов, представлял страны Восточной Европы в комитете ВОЗ/ЮНФПА/ЮНИСЕФ.

Лауреат премии Москвы в области медицины за 2009 год за работу «Создание и внедрение в практическое здравоохранение системы диагностики и лечения первичных и вторичных иммунодефицитов у взрослых» и премии Правительства Российской Федерации в области образования за 2012 год за работу «Создание и внедрение учебных и научно-практических изданий по иммунологии в систему высшего образования Российской Федерации», победитель открытого конкурса «Лучший преподаватель медицинского вуза» в номинации – «За подготовку научно-педагогических кадров», отмечен правительственными и ведомственными наградами.

Редакционная коллегия «Российского биотерапевтического журнала» поздравляет Александра Викторовича Караулова с юбилеем, желает ему новых творческих успехов в науке и жизни.



**КАНЦЕРОГЕННЫЙ ЭФФЕКТ СМЕСИ ФОРМАЛЬДЕГИДА
И ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА ПРИ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ВВЕДЕНИИ КРЫСАМ**

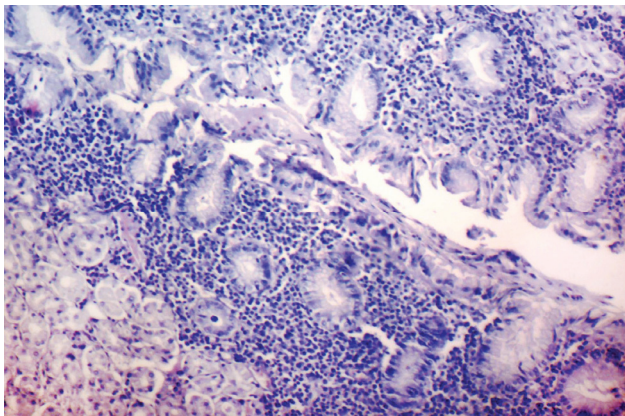


Рис. 1. Перстневидно-клеточный рак желудка в пределах слизистой оболочки: окраска гематоксилин Майера и эозин, $\times 200$.

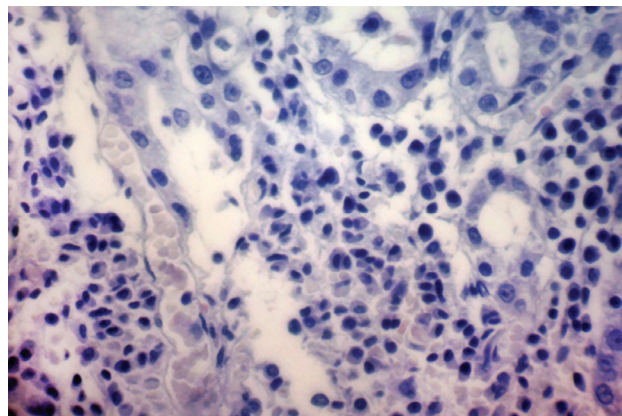


Рис. 2. Перстневидно-клеточный рак желудка в пределах слизистой оболочки: окраска гематоксилин Майера и эозин, $\times 600$.

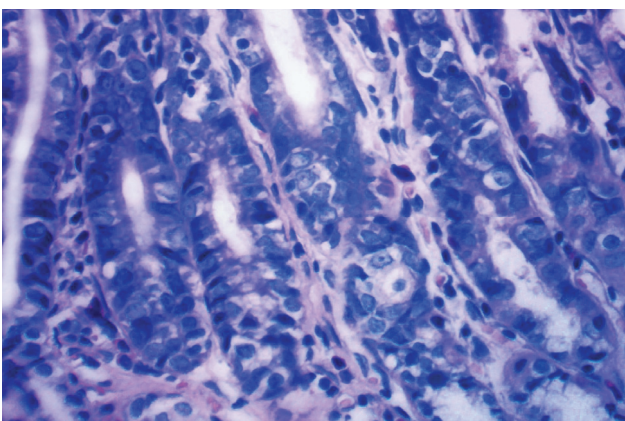


Рис. 3. Очаги высокодифференцированной аденокарциномы с поражением базальных отделов фундальных желез желудка: окраска гематоксилин Майера и эозин. $\times 200$.

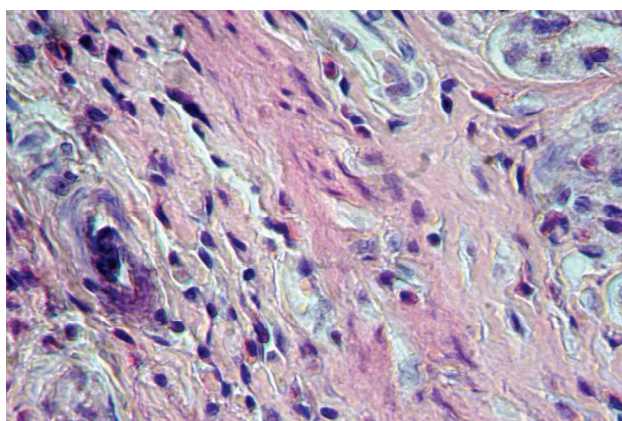


Рис. 4. Умеренно дифференцированная аденокарцинома желудка в пределах слизистой желудка. Инвазия опухолевых клеток в собственную пластинку и подслизистую основу органа: окраска гематоксилин Майера и эозин, $\times 200$.

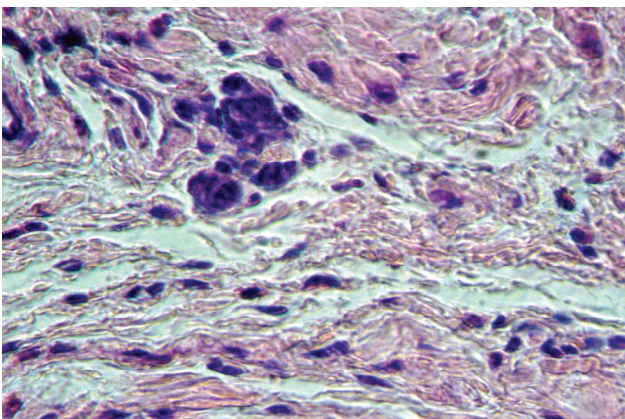


Рис. 5. Разрастания перстневидно-клеточного рака в подслизистой основе желудка. Отмечается различная реакция опухолевых клеток на панцитокератин (от выраженной, до практически ее отсутствия): иммуногистохимическая окраска с антителами к панцитокератину (AE1/AE3), $\times 200$.

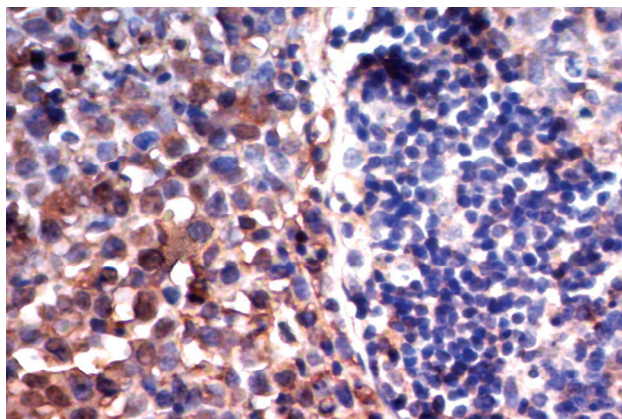


Рис. 6. Опухолевый эмбол в кровеносном сосуде подслизистой основы желудка: окраска гематоксилин Майера и эозин, $\times 600$.

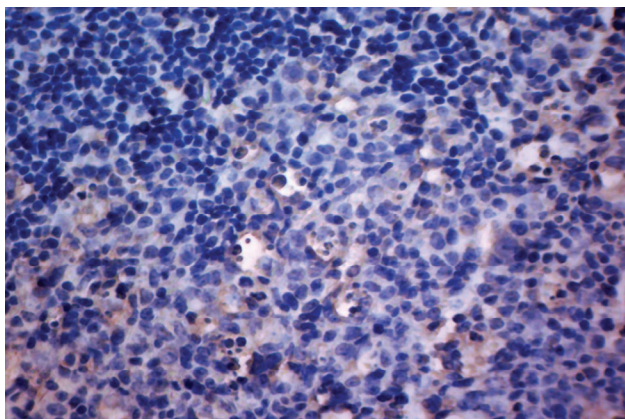


Рис. 7. Скопление опухолевых клеток в подслизистой основе слизистой оболочки желудка: окраска гематоксилин Майера и эозин, $\times 600$.

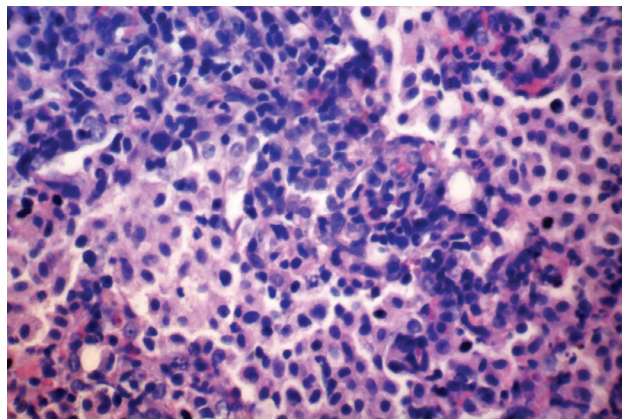


Рис. 8. Метастаз рака желудка в лимфоузле большого сальника. Положительная реакция на панцитокератин (AE1/AE3) в цитоплазме опухолевых клеток: иммуногистохимическая окраска с антителами к панцитокератину (AE1/AE3), $\times 600$.

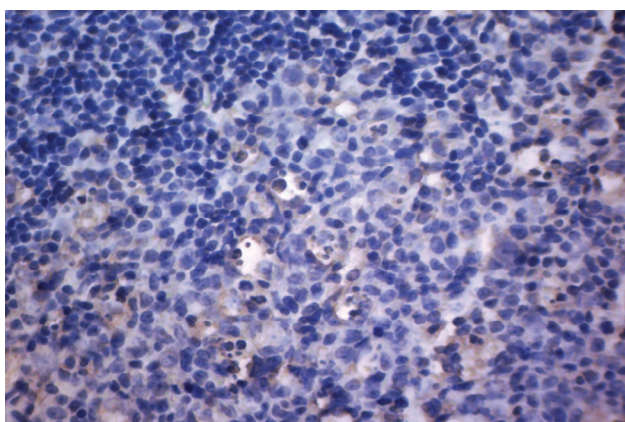


Рис. 9. Диссеминаты рака желудка по брюшине тонкой кишки: иммуногистохимическая окраска с антителами к панцитокератину (AE1/AE3), $\times 600$.

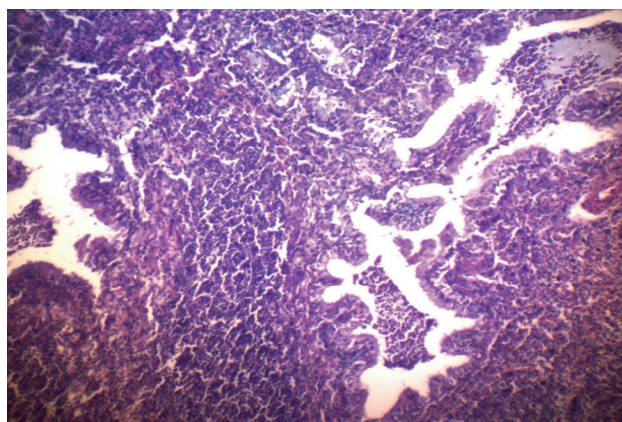


Рис. 10. Опухолевое поражение ткани легкого: окраска гематоксилин Майера и эозин, $\times 200$.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН

