



ISSN 1726-9784

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



**Russian Journal
of Biotherapy**

3

ТОМ 15
2016

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

ISSN 1726-9784

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

УЧРЕДИТЕЛИ

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

З.С. Шпрах, канд. фарм. наук

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

А.В. Караулов, чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, проф.;
М.А. Барышникова, канд. фарм. наук

РЕДКОЛЛЕГИЯ

И.А. Балдуева, д-р мед. наук (Санкт-Петербург); **О.А. Бочарова**, д-р биол. наук, проф. (Москва);
А.К. Голенков, д-р мед. наук, проф. (Москва); **М.И. Давыдов**, д-р мед. наук, проф., академик РАН (Москва);
Л.В. Демидов, д-р мед. наук, проф. (Москва); **М.В. Дмитриева**, ответственный секретарь (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); **В.П. Краснов**, д-р хим. наук, проф. (Екатеринбург);
И.Ю. Кубасова, канд. мед. наук (Москва); **И.Г. Меерович**, канд. биол. наук (США);
А.В. Мисюрин, канд. биол. наук (Москва); **В.В. Новиков**, д-р биол. наук, проф. (Нижний Новгород);
Н.А. Оборотова, д-р фарм. наук, проф. (Москва); **Н.Я. Рапопорт**, д-р хим. наук, проф. (США);
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); **Ю.В. Шишкин**, д-р мед. наук, проф. (Москва);
И.Ж. Шубина, д-р биол. наук (Москва); **Р.И. Якубовская**, д-р биол. наук, проф. (Москва)

ОСНОВАН В 2002 Г.

3 ^{ТОМ 15}
'16

Издательская группа РОНЦ:
115478, Москва, Каширское ш., 24
Турнянская Е.Г., Крюков Б.Б.

115478 Москва, Каширское ш., 24
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России,
НИИ экспериментальной
диагностики и терапии опухолей
Тел.: +7(499) 324 10 65;
факс +7(499) 324 22 74
E-mail: bioterapy_rbj@mail.ru

Адрес редакции:
115478, Москва,
Каширское шоссе, 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Редактор **А.В. Лукина**
Корректор **О.С. Капполь**
Дизайн **Е.В. Степанова**
Верстка **О.В. Гончарук**

Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций
(Роскомнадзор). Регистрационный
номер: № 77-11695 от 21.01.2002 г.,
ПИ № ФС77-53039 от 04.03.2013 г.
При полной или частичной
перепечатке материалов
ссылка на журнал «Российский
биотерапевтический журнал»
обязательна.

ISSN 1726-9784
Российский биотерапевтический
журнал. 2016. Том 15.
№ 3. 1–102

Подписной индекс в каталоге
агентства «Роспечать» – 81679
Отпечатано в типографии
ООО «Медиаколор»
Тираж 1000 экз.

www.ronc.ru/node/795

Мероприятия в 2017 г.



Глубокоуважаемые коллеги!

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей,

Институт органического синтеза имени И.Я. Постовского Уральского отделения РАН

в марте 2017 г. проводят XIV Всероссийскую научно-практическую конференцию с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» имени А.Ю. Барышникова.

Тезисы и тексты докладов конференции будут опубликованы в «Российском биотерапевтическом журнале».

Оргкомитет оставляет за собой право отбора докладов.

Принять участие в конференции можно, выслав регистрационную форму и тезисы доклада на электронную почту: edito@ronc.ru

Срок подачи заявки для участия с докладом – **25 января 2017 г.**

Срок подачи тезисов (для публикации) – **25 января 2017 г.**

Регистрация участников – **до 1 марта 2017 г.**

По всем вопросам, связанным с участием в конференции, обращаться к секретарю Оргкомитета Решетниковой Вере Владимировне: тел. +7 (499) 324-55-85, +7 (926) 505-72-55; e-mail: edito@ronc.ru

Март
2017 г.
Москва

XIV ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ» ИМЕНИ А.Ю. БАРЫШНИКОВА

Место проведения: г. Москва, ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Каширское шоссе, 24 (Большой актовый зал).

Основные научные направления:

- доклинические и клинические исследования лекарственных средств;
- разработка лекарственных препаратов;
- отечественные противоопухолевые препараты;
- направленная доставка лекарственных препаратов;
- диагностика и лечение онкологических заболеваний;
- фотодинамическая терапия;
- иммунотерапия и биотерапия опухолей.

Планируемые мероприятия конференции:

секции: пленарная, экспериментальная онкология, клиническая онкология, фотодинамическая терапия, стендовая секция, секция молодых ученых;

выставка «Противоопухолевые и диагностические препараты».

The "Russian Journal of Biotherapy" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of periodicals (the list of leading peer-reviewed scientific journals recommended to publish the basic research results of doctor's and candidate's theses)

ISSN 1726-9784

Russian Journal of Biotherapy

PEER-REVIEWED THEORETICAL AND SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

FOUNDERS

Federal State Budgetary Scientific Institution "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center"
of the Ministry of Health of Russia

Research Institute of Experimental Diagnostic and Therapy of Tumors

EDITOR-IN-CHIEF

Z.S. Shprakh, PhD

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

A.V. Karaulov, PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS (Moscow, Russia);

M.A. Baryshnikova, PhD (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

I.A. Baldueva, PhD, DSc (Saint Petersburg, Russia); O.A. Bocharova, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia);
A.K. Golenkov, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); M.I. Davydov, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS
(Moscow, Russia); L.V. Demidov, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); M.V. Dmitrieva, Executive Editor
(Moscow, Russia); I.V. Evsegneeva, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); P.K. Ivanov, PhD, DSc (Moscow, Russia);
Z.G. Kadagidze, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); V.P. Krasnov, PhD, DSc, Professor (Ekaterinburg, Russia);
I.Y. Kubasova, PhD (Moscow, Russia); I.G. Meerovich, PhD (Omaha, Nebraska, USA); A.V. Misyurin, PhD
(Moscow, Russia); V.V. Novikov, PhD, DSc, Professor (Nizhniy Novgorod, Russia); N.A. Oborotova, PhD, DSc,
Professor (Moscow); N.Ya. Rapoport (Salt Lake City, Utah, USA); V.V. Reshetnikova, PhD (Moscow, Russia);
N.S. Sergeeva, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); E.V. Stepanova, PhD, DSc (Moscow, Russia);
N.N. Tupitsin, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); E.G. Turnyanskaya, PhD (Moscow, Russia);
Yu.V. Shishkin, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); I.Zh. Shubina, PhD, DSc (Moscow, Russia);
R.I. Yakubovskaya, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia)

FOUNDED IN 2002

3^{VOL. 15}
'16

**Publishing group of "N.N. Blokhin
Russian Cancer Research Center"**
24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478
Turnyanskaya E.G., Kryukov B.B.

FSBI "N.N. Blokhin Russian Cancer
Research Center" of the Ministry
of Health of Russia, Research Institute
of Experimental Diagnostic and Therapy
of Tumors. Tel.: +7(499) 324 10 65
Fax: +7(499) 324 22 74
e-mail: biotherapy_rbj@mail.ru

Editorial Office:

Research Institute of Carcinogenesis,
Floor 3, 24 Kashirskoye Shosse, Build. 15,
Moscow, 115478.
Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Editor A.V. Lukina
Proofreader O.S. Kappol
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk

*The journal is registered at the
Federal Service for Supervision
of Communications, Information
Technology, and Mass Media
Registration number: ПИ № 77-11695
dated 21.01.2002; ПИ № ФЦ77-53039
dated 04.03.2013*

**If materials are reprinted
in whole or in part, reference
must necessarily be made
to the "Rossiysky
Bioterapevtichesky Zhurnal".**

ISSN 1726-9784
Rossiysky Bioterapevtichesky
Zhurnal. 2016. Volume 15.
No 3. 1–102

Rospechat' catalogue
index: 81679
Printed at the
Mediacolor LLC
1,000 copies

www.ronc.ru/node/795

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>М.Д. Фармаковская, Н.В. Хромова, Б.П. Копнин, П. Б., Копнин</i> Повышение туморогенного потенциала клеток рака ободочной кишки человека линии НСТ116 за счет увеличения содержания раковых стволовых клеток при подавлении экспрессии E-кадгерина	6
<i>Н.В. Никитенко, М.А. Сеньчукова, О.Н. Томчук, Н.В. Зайцев, А.А. Стадников, С.О. Митряков, А.М. Дегтярев, Д.В. Киртбая</i> Морфологическая характеристика и прогностическое значение разных типов сосудов при раке молочной железы	15
<i>Л.В. Татьянаенко, И.В. Выстороп, О.В. Доброхотова, И.Ю. Пихтелева, А.И. Котельников</i> Влияние циклических гидроксамовых кислот на активность Ca ²⁺ -АТФазы саркоплазматического ретикулула и фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата	23
<i>Т.М. Соколова, В.В. Полосков, О.С. Бурова, А.Н. Шувалов, З.А. Соколова, А.Н. Иншаков, Ю.В. Шишкин, Ф.И. Ершов</i> Действие интерферонов и индукторов интерферонов на экспрессию генов рецепторов TLR/RLR и дифференцировку опухолевых линий клеток ТНР-1 И НСТ-116	28
<i>Д.А. Афанасьева, В.А. Мисюрин, А.В. Пономарев, И.М. Лученко, О.С. Бурова, М.А. Барышникова</i> Изменение уровня экспрессии гена CD95/FAS в клетках линий меланомы под воздействием липосомальной формы аранозы	34
<i>Н.В. Андропова, С.М. Ситдикова, Л.Ф. Морозова, А.А. Лушникова, Д.А. Понкратова, И.Н. Михайлова, Н.Т. Райхлин, И.А. Букаева, Е.М. Трещалина</i> Моделирование подкожного ксенографта меланомы кожи человека <i>mel Ras</i> с мутацией <i>NRAS</i> на иммунодефицитных мышах для доклинического изучения таргетных противоопухолевых средств	40
<i>Э.Р. Переверзева, И.Д. Трещалин, М.И. Трещалин, Е.В. Возняковская, Т.Б. Переверзева, Н.В. Еремкин, Н.В. Булушова, Е.П. Санникова</i> Оценка побочных эффектов биомодифицированной L-аспарагиназы Was79 в хроническом эксперименте на кроликах	47
<i>З.С. Шпрах, Е.В. Игнатьева, И.В. Ярцева, Н.А. Дмитричева, Л.И. Смирнова</i> Разработка и валидация методики количественного определения цифетрилина в таблетках.	55
<i>А.А. Николина, Н.Ю. Кульбачевская, О.И. Коняева, В.А. Чалей, Н.П. Ермакова, В.М. Бухман</i> Изучение субхронической токсичности гликозидного производного индолокарбазола LCS-1208 на крысах.	62
<i>Д.Ю. Блохин, П.К. Иванов, Н.К. Власенкова, И.В. Чинарева, И.Б. Шоуа</i> Алгоритм количественного определения уровня простатспецифического антигена у больных аденокарциномой предстательной железы	70
<i>Н.А. Фалалева</i> Рефрактерное течение фолликулярной лимфомы и короткие сроки жизни больных в эру препаратов направленного действия. В чем причина?	79

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

<i>С.А. Калюжный, Е.А. Дудко, В.Т. Заркуа, Е.А. Богуш, В.Ю. Кирсанов, С.Д. Коломийцев, Н.О. Вихлянцева, А.С. Тюляндина, Т.А. Богуш</i> Количественный иммунофлуоресцентный анализ белка RRM1 в ткани серозной аденокарциномы яичников методом проточной цитофлуориметрии	87
<i>Л.Ф. Морозова, Н.М. Сураева, О.С. Бурова, А.Е. Бармашов, М.А. Барышникова</i> Изменение морфологических и иммунологических характеристик клеток меланомной линии (<i>mel Cher</i>) при культивировании в ростовой среде с низкой концентрацией эмбриональной телячьей сыворотки.	90
<i>М.М. Давыдов, И.А. Мамичев, Е.А. Дудко, Е.А. Богуш, В.Ю. Кирсанов, Б.Е. Полоцкий, М.И. Давыдов, Т.А. Богуш</i> Количественная оценка экспрессии бета-III-тубулина в тканях аденокарциномы и плоскоклеточного рака легкого	95
<i>Н.Н. Тупицын, Н.А. Фалалева, А.В. Моженкова, А.И. Павловская</i> Роль костного мозга в прогнозе фолликулярной лимфомы	99

ORIGINAL REPORTS

- M.D. Farmakovskaya, N.V. Khromova, B.P. Kopnin, P.B. Kopnin*
E-cadherin expression downregulation elevates tumorigenic potential of human colon cancer cell line HCT116 via increase in cancer stem cells amount. 6
- N.V. Nikitenko, M.A. Senchukova, O.N. Tomchuk, N.V. Zaitsev, A.A. Stadnikov, S.O. Mitriakov, A.M. Degtiarev, D.V. Kirtbaia*
Morphological characteristic and clinical value of different types of tumor vessels in breast cancer 15
- L.V. Tai'yanenko, I.V. Vystorop, O.V. Dobrokhotova, I.Yu. Pikhteleva, A.I. Kotelnikov*
The effect of cyclic hydroxamic acids on activity of Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum and cyclic guanosine monophosphodiesterase 23
- T.M. Sokolova, V.V. Poloskov, O.S. Burova, A.N. Shuvalov, Z.A. Sokolova, A.N. Inshakov, Yu.V. Shishkon, F.I. Ershov*
Action interferons and *ifn*-inductors on TLR/RLRs genes expression and differentiation of tumor cell lines THP-1 and HCT-116 28
- D.A. Afanasieva, V.A. Misyurin, A.V. Ponomarev, I.M. Luchenko, O.S. Burova, M.A. Baryshnikova*
Liposomal aranose can change mRNA *CD95/FAS* expression level in melanoma cell lines. 34
- N.V. Andronova, S.M. Sitdikova, L.F. Morozova, A. A. Lushnikova, D.A. Ponkratova, I.N. Mikhailova, N.T. Raychlin, I.A. Bukaeva, H.M. Treshalina*
Modeling of a subcutaneous xenograft of human melanoma skin mel Rac with *NRAS* mutation on immunodeficient mice for preclinical studying the targeting anticancer drugs 40
- E.R. Pereverzeva, I.D. Treschalina, M.I. Treschalina, E.V. Voznyakovskaya, T.B. Pereverzeva, N.V. Eremkin, N.V. Bulushova, E.P. Sannikova*
Evaluation of biomodified L-asparaginase Was79 side effects in chronic experiment on rabbits. 47
- Z.S. Shprakh, E.V. Ignatieva, I.V. Yartseva, N.A. Dmitricheva, L.I. Smirnova*
Development and validation of cyphetrylin assay in tablets. 55
- A.A. Nikolina, N.Ju. Kul'bachevskaja, O.I. Konjaeva, V.A. Chalej, N.P. Ermakova, V.M. Bukhman*
Research of subchronic toxicity in rats of glycoside derivative of indolocarbazole LCS-1208. 62
- D.Yu. Blokhin, P.K. Ivanov, N.K. Vlasenkova, I.V. Chinareva, I.B. Showa*
The algorithm of quantitative detection of prostate specific antigen at patients with a prostate adenocarcinoma. 70
- N.A. Falaleeva*
Refractory follicular lymphoma and short-term patients survival in the era of targeted treatment. What is the reason? 79

BRIEF REPORT

- S. A Kaliuzhny, E.A. Dudko, V.T. Zarkua, E.A. Bogush, V.Ju. Kirsanov, S.D. Kolomyitsev, N.O. Vichlyantseva, A.S. Tjulandina, T.A. Bogush*
Quantitative immunofluorescent detection of RRM1 protein in ovarian cancer tissue by flow cytometry 87
- L.F. Morozova, N.M. Suraeva, O.S. Burova, A.E. Barmashov, M.A. Baryshnikova*
Changes in the morphological and immunological characteristics of mel cher melanoma cells in response to low concentration of embryo calf serum 90
- M.M. Davydov, I.A. Mamichev, T.A. Bogush, E.A. Dudko, E.A. Bogush, V.Ju. Kirsanov, B.E. Polotsky, M.I. Davydov*
Quantitative assessment of beta-iii tubulin expression in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. 95
- N.N. Tupitsyn, N.A. Falaleeva, A.M. Mozhenkova, A.I. Pavlovskaya*
Bone marrow in follicular lymphoma prognosis 99

ПОВЫШЕНИЕ ТУМОРОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТОК РАКА ОБОДОЧНОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ НСТ116 ЗА СЧЕТ УВЕЛИЧЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ РАКОВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ПОДАВЛЕНИИ ЭКСПРЕССИИ E-КАДГЕРИНА

М.Д. Фармаковская, Н.В. Хромова, Б.П. Копнин, П. Б. Копнин

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Павел Борисович Копнин pbkopnin@mail.ru

Введение. Для многих злокачественных новообразований человека характерна aberrантная экспрессия или утрата E-кадгерина, что является пусковым механизмом для эпителиально-мезенхимального перехода. Прохождение эпителиально-мезенхимального перехода, в свою очередь, может способствовать приобретению трансформированными клетками свойств так называемых раковых стволовых клеток (РСК).

Цель исследования — изучение влияния экспрессии E-кадгерина на долю РСК в популяции клеток аденокарциномы толстой кишки человека НСТ116.

Материалы и методы. Созданы сублинии клеток НСТ116 с повышенной и подавленной экспрессией E-кадгерина, в которых мы оценивали долю РСК с помощью тестов на минимальную прививочную дозу, колониобразование в полужидкой среде, а также определяли профиль экспрессии маркеров плюрипотентности.

Результаты и выводы. Мы показали, что доля РСК в популяции клеток аденокарциномы толстой кишки человека НСТ116 зависит от уровня экспрессии E-кадгерина. Подавление продукции этого белка приводит к повышенной экспрессии генов, ответственных за плюрипотентное состояние клетки, и увеличению доли РСК через активацию сигнального пути Wnt/ β -катенин. Гиперэкспрессия E-кадгерина имеет противоположный эффект и снижает количество РСК в популяции клеток НСТ116. Таким образом, в противоопухолевой терапии колоректального рака могут быть перспективными терапевтические подходы, восстанавливающие экспрессию E-кадгерина.

Ключевые слова: раковые стволовые клетки, эпителиально-мезенхимальный переход, E-кадгерин, колоректальный рак

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-06-14

E-CADHERIN EXPRESSION DOWNREGULATION ELEVATES TUMOROGENIC POTENTIAL OF HUMAN COLON CANCER CELL LINE HCT116 VIA INCREASE IN CANCER STEM CELLS AMOUNT

M.D. Farmakovskaya, N.V. Khromova, B.P. Kopnin, P.B. Kopnin

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Introduction. E-cadherin aberrant expression or complete loss is common for a number of human malignant neoplasms, and can be a launching mechanism of an epithelial-mesenchymal transition. Passing through epithelial-mesenchymal transition could in turn promote to the acquisition of so called cancer stem cell phenotype by the transformed cells.

The objective of the present study is to reveal the influence of E-cadherin expression level on the amount of cancer stem cells in human colon cancer cell line HCT116.

Materials and methods. We have created cell sublines with E-cadherin up- and downregulation and assessed the percentage of cancer stem cells using tumor formation assay, clonogenic assay; we also evaluated profile of cell pluripotency markers.

Results and conclusion. We have shown that the proportion of cancer stem cells in human colon adenocarcinoma cell line HCT116 depends on the E-cadherin expression level. E-cadherin expression downregulation results in elevated expression of pluripotency genes and in the increase of proportion of cancer stem cells via activation of Wnt/ β -signalling pathway. E-cadherin upregulation has a reverse effect and decreases the amount of HCT116 cancer stem cells. Thus, E-cadherin expression restoration seems prospective in colorectal anticancer therapy.

Key words: cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition, E-cadherin, colorectal cancer

Введение

Е-кадгерин является трансмембранной кальций-зависимой адгезионной молекулой, характерной для большинства эпителиальных клеток. Он играет важную роль в эмбриогенезе и поддержании эпителиальных тканей взрослого организма, и его утрата или нарушение функций может приводить к развитию новообразований [1, 2]. Для многих злокачественных новообразований человека показано снижение или отсутствие экспрессии Е-кадгерина в результате мутаций в его гене *CDH1*, эпигенетической или транскрипционной регуляции, что позволяет рассматривать данный белок в качестве опухолевого супрессора [3]. Показано, что существует взаимосвязь между экспрессией Е-кадгерина и неблагоприятным течением заболевания. Так, в отношении злокачественных новообразований молочной железы, желудка, поджелудочной железы известно, что утрата экспрессии Е-кадгерина приводила к переходу от хорошо дифференцированной В-клеточной аденомы поджелудочной железы к инвазивной карциноме [4]; для колоректальных опухолей показано, что утрата Е-кадгерина ассоциирована с агрессивным ростом и метастазированием [5].

Известно, что утрата экспрессии Е-кадгерина трансформированными клетками может приводить к эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП) [6, 7]. В последнее время появляется все больше данных, указывающих на связь между прохождением клеток через ЭМП и приобретением ими свойств раковых стволовых клеток (РСК) [8, 9]. РСК – небольшая популяция трансформированных клеток, обладающая туморогенным потенциалом. Предполагают, что РСК возникают из нормальных стволовых клеток организма и обладают рядом свойств, позволяющих выделить их из основной массы злокачественных клеток [10, 11]. Одним из таких свойств является профиль поверхностных маркеров. Так, для РСК толстой кишки человека описаны поверхностные антигены CD133, CD44, ALCAM или фермент альдегиддегидрогеназа ALDH1 [12]. Согласно современным представлениям именно РСК являются причиной устойчивости к терапии и рецидивирования заболевания [13]. Таким образом, РСК представляются перспективной мишенью для таргетной терапии злокачественных новообразований, однако накапливаются данные, указывающие на существование сложных механизмов поддержания определенной доли РСК, возможно, за счет взаимного перехода трансформированных клеток между «стволовым» и «нестволовым» состояниями [14, 15].

Пути приобретения опухолевыми клетками фенотипа РСК изучены недостаточно, но известно, что изменения экспрессии ряда генов (*TAZ*, *WNT*, *SHH*, *DKK-1*, *PTEN*, *BMI-1*) могут приводить к изменению доли РСК в популяции опухолевых клеток [16–19].

Более того, известно, что подавление экспрессии Е-кадгерина увеличивает туморогенность трансформированных эпителиальных клеток молочной железы HMLER и клеток аденокарциномы легкого A549 [20]. Однако есть работы, показывающие, что только Е-кадгерин-положительные клетки аденокарциномы предстательной железы имеют фенотип РСК и увеличение экспрессии Е-кадгерина приводит к увеличению доли РСК [21]. Ранее нами было показано, что ингибирование фактора роста эндотелия сосудов VEGF-C приводит к увеличению экспрессии Е-кадгерина и уменьшает долю РСК в популяции клеток аденокарциномы толстой кишки человека HCT116 [22]. Принимая во внимание, что утрата Е-кадгерина в адгезионных контактах является основным событием, запускающим ЭМП, а трансформированные клетки, прошедшие ЭМП, могут приобретать свойства РСК, в настоящей работе мы изучили влияние непосредственных изменений экспрессии Е-кадгерина на проявление свойств и долю РСК в популяции клеток HCT116. Полученные данные показывают, что подавление экспрессии Е-кадгерина в клетках линии аденокарциномы толстой кишки человека HCT116 приводит к прохождению клетками ЭМП и увеличению доли РСК в популяции, в то время как увеличение экспрессии Е-кадгерина, наоборот, способствует снижению доли РСК.

Материалы и методы

Клеточные линии

В работе использовали клеточную линию аденокарциномы толстой кишки человека HCT116 (ATCC# CCL-247) и ее сублинии с измененной экспрессией гена Е-кадгерина (*CDH1*). Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и пенициллина/стрептомицина при 37 °C и 5 % CO₂.

Создание конструкций, экспрессирующих CDH1 и мiРНК к гену CDH1

При создании конструкции, экспрессирующей *CDH1*, кДНК данного гена (синтезированная и любезно предоставленная проф. М.С. Трояновским [23]) была клонирована в лентивирусный вектор pLenti6 (Invitrogen, США). При создании конструкции, экспрессирующей малую интерферирующую РНК гена *CDH1*, мы использовали лентивирусный вектор pLKO 1-puro (Sigma, Германия). На основе библиотеки MISSION shRNA Library (Sigma-Aldrich, Германия) были выбраны 5 малых интерферирующих РНК, гомологичных мРНК (ref NM_004360.3) человеческого гена Е-кадгерина (*CDH1*):

№ 13' – CCAGTGAACAACGATGGCATT–5' (гомологичная 1409–1429 нуклеотидной последовательности мРНК гена *CDH1*),

№ 23' – CGATTCAAAGTGGGCACAGAT–5' (344–364 нт),

№ 33' – GCAGAAATTATTGGGCTCTTT–5' (3858–3878 нт),

№ 43' – CCAAGCAGAATTGCTCACATT–5' (529–549 нт),

№ 53' – CCAACCCAAGAATCTATCATT–5' (2057–2077 нт),

и протестированы на линии клеток НСТ116; наиболее эффективно подавляли экспрессию Е-кадгерина две из них (№ 1, 2).

Для получения вектора, стабильно экспрессирующего shCDH1, были синтезированы олигонуклеотиды (Evrogen, Россия): для shCDH1№ 1 – 5'–CCGGCCAGTGAACAACGATGGCATTCTCGAGAATGGCATCGTTCAGTGGTTTTTG–3', для shCDH1№ 2 – 5'–CCGGCCAGTCAAGTGGGCACAGATCTCGAGATCTGTGCCACTTTGAATCGTTTTTG–3', а также последовательности, комплементарные им. Образованный в результате гибридизации комплементарных олигонуклеотидов фрагмент двуцепочечной ДНК, в состав которого была включена повторенная через шпилечную структуру последовательность shCDH1 (выделена жирным курсивом), гомологичная участку человеческой мРНК *CDH1*, был клонирован в вектор pLKO.1-uro по сайтам рестрикции эндонуклеаз AgeI и EcoRI. Из двух полученных конструкций для дальнейших исследований была отобрана pLKO.1-shCDH1№ 1, наиболее эффективно подавляющая экспрессию гена Е-кадгерина.

Получение клеточных сублиний с различной экспрессией Е-кадгерина

Для получения инфекционных лентивирусных частиц pLKO.1-shGFP (контроль), pLKO.1-shCDH1, pLenti6-CDH1 использовали клетки-упаковщики HEK293FT (Invitrogen, США) и реагент ExGen 500 (Fermentas, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Сбор вирусных частиц проводили каждые 12 ч в течение 72 ч, затем инфицировали клетки НСТ116. Селекцию клеток, экспрессирующих pLKO.1-shGFP и pLKO.1-shCDH1, проводили с использованием пуромидина (1мкг/мл), клеток, экспрессирующих pLenti6-CDH1, – с использованием бластицидина (1мкг/мл) в течение 5 дней.

Определение уровня экспрессии генов

Тотальную мРНК выделяли с помощью TRI Reagent (Sigma, Германия). Реакцию обратной транскрипции проводили, как описано ранее [24]. Для определения уровней экспрессии мРНК использовали праймеры:

Е-кадгерин: прямой 5'–GTCTGTAGGAAGGCA-CAGCC–3', обратный 5'–TGCAACGTCGTTAC-GAGTCA–3';

c-Мус: прямой 5'–GCTTCTCAGAGGCTTGGC-GGGAAA–3', обратный 5'–CCTGGGGGATCAAG-CGGGAGG–3';

Нестин: прямой 5'–GCGGCTGCGGGCTACT-GAAA–3', обратный 5'–ATCCAAGACGCCGGCC-CTCT–3';

Sox2: прямой 5'–TGGACAGTTACGCGCACAT–3', обратный 5'–CGAGTAGGACATGCTGTAGGT–3';

Oct3/4: прямой 5'–GTGTTTCAGCCAAAAGAC-CATCT–3', обратный 5'–GGCCTGCATGAGGGT-TTCT–3';

Wnt1: прямой 5'–AGGCAGGCCGTACGACCG-TA–3', обратный 5'–CGGGTGGCGAATAACCG-GG–3';

α-тубулин: прямой 5'–GTTGGTCTGGAATTCT-GTCAG–3', обратный 5'–AAGAAGTCCAAGCTG-GAGTTC–3'.

Использовали для выравнивания образцов кДНК.

Вестерн-блот-гибридизация

Для приготовления тотальных белковых лизатов клетки лизировали в RIPA буфере. Пробы нормализовали по методу Бредфорда. Белки разделяли в 8–12 % полиакриламидном геле и переносили их на PVDF-мембрану (Millipore, Германия). Для выявления белков использовали антитела к Е-кадгерину (M126, TaKaRa), к β-катенину (610154, BD Transduction Laboratories, США), в качестве контроля количества нанесенного белка детектировали α-тубулин (sc-23948, Santa Cruz Biotechnology, США), использовали вторичные Alexa488-конъюгированные антитела (Invitrogen, США). Детекцию флуоресценции проводили на приборе Turphoon 9410 (GE Healthcare, США).

Иммунофлуоресцентная микроскопия

Клетки на покровном стекле фиксировали на 4-й день после посева 1 % раствором параформальдегида в течение 15 мин и метанолом в течение 5 мин при –20 °С. Клетки инкубировали с первичными антителами (см. раздел «Вестерн-блот-гибридизация») и вторичными антителами, конъюгированными с AlexaFluor594- или Alexa488-флуорохромами (Invitrogen, США). Изображения получены с помощью флуоресцентного микроскопа AxioPlan 2 (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения AxioVision (Carl Zeiss Imaging Systems).

Определение уровня активности люциферазы

Для определения TCF/LEF-транскрипционной активности использовали коммерчески доступную люциферазную лентивирусную TCF/LEF-зависимую репортерную конструкцию (Signal Lenti TCF/LEF Reporter (luc) Kit: CLS-018L, Qiagen, Германия) и си-

стему Steady-Glo Luciferase Assay System (E2510, Promega, США) согласно протоколу производителя, полученные значения нормализовали относительно содержания общего количества белка в образцах.

Определение миграционной активности клеток

В лунки 24-луночной плашки вставляли камеру Бойдена с диаметром пор 8 мкм, внутрь которой сеяли 50 000 клеток. Через 24 ч клетки, оставшиеся сверху в камере, убирали. Мигрировавшие клетки фиксировали и окрашивали трипановым синим. Миграционную активность определяли подсчетом числа клеток на нижней поверхности мембраны в 10 полях зрения (п. з.) при 200-кратном увеличении.

Определение количества клеток, исключая краситель Rhodamine 123

10^6 клеток/мл ресуспендировали в теплом растворе HBSS с добавлением 2 % эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки сначала инкубировали с 1 мг/мл красителя Rhodamine 123 (R8004, Sigma), затем добавляли 10 мг/мл красителя Propidium Iodide (P4170, Sigma). Окрашивание Rhodamine 123 детектировали с помощью проточного BD FACSCanto II (BD, США), использовали фильтры 530/30 (BP) для красителя Rhodamine 123 и 630/22 BP для красителя Propidium Iodide. В каждом эксперименте оценивали 10^7 событий. Дальнейший анализ проводили с помощью программ BD FACSDiva Software (BD, США) and WinMDI (Joseph Trotter, США).

Анализ колониеобразования в неприкрепленных условиях

200 клеток ресуспендировали в 2-кратной среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональную телячью сыворотку с 1,3 % метилцеллюлозой (Fluka, Германия), помещали на неадгезивные чашки Петри и культивировали в течение 14 дней, окрашивали кристаллическим фиолетовым. Подсчет колоний производили с помощью программы TotalLab v. 2.01, модуля Colony Counter (Nonlinear Dynamics).

Анализ скорости роста *in vitro*

Клетки рассеивали в 6-луночные чашки 25 000 на каждую лунку. Для определения скорости роста проводили подсчет количества клеток в камере Горяева каждые 48 ч в течение 8 дней.

Анализ прививаемости опухолевых клеток

В работе использовали самок бестимусных мышей линии D2 × J [24] в возрасте 6–8 нед. Каждому животному подкожно прививали по 4 опухоли: 2×10^6 , 10^6 , $0,5 \times 10^6$, $0,25 \times 10^6$ клеток, суспендированных в 100 мкл физиологического раствора. Через 21 день после инъекции путем пальпации определя-

ли наличие опухоли под кожей. Эксперименты проводили трижды для подтверждения результатов.

Анализ скорости роста *in vivo*

Размер ксенографтов измеряли каждые 3 дня, их объем высчитывали по формуле: (ширина)² × (длина) × 0,5.

Продолжительность эксперимента составила 21 день, сформировавшиеся опухоли использовали для иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания.

Иммуногистохимическое окрашивание

Ксенографты фиксировали в 4 % формальдегиде в течение 24 ч и заключали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм подвергали депарафинированию, затем обрабатывали в цитратном буфере для демаскировки антигена рН6.0 (Dako, S1699) при 94 °С 40 мин. Активность эндогенной пероксидазы ингибировали 3 % H₂O₂ 10 мин. После этого срезы инкубировали с первичными антителами крысы к CD34 (BD Pharmingen, 553731), в течение 1 ч, затем со вторичными антителами, меченными биотином (BD Pharmingen, 559286) в течение 30 мин, далее 15 мин со стрептавидин-HRP-проявочной системой (Dako, K0690). Визуализацию окрашивания проводили, используя систему DAB+ (Dako, K3468) согласно протоколу фирмы. После этого препараты докрашивали гематоксилином Майера (Glycergel, Dako). После демаскировки все инкубации проводили при комнатной температуре.

Подсчет CD34⁺ капилляров

Препараты опухолевых тканей использовали для проведения морфометрического анализа присутствия кровеносных капилляров, выявляемых с помощью ИГХ-окрашивания на CD34. CD34⁺-структуры с просветами, длина которых ≥ 100 мкм, подсчитывали при 100-кратном увеличении, их плотность на срезе опухоли оценивали по среднему количеству. Анализировали по 3–7 п. з. для каждой опухоли в экспериментальной группе.

Статистика

Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего по результатам как минимум 3 независимых экспериментов. Для статистической оценки результаты были проанализированы с помощью t-теста Стьюдента. Значения считали статистически достоверными при $p \leq 0,05$. Все эксперименты были проведены не менее 3 раз.

Результаты и обсуждение

Чтобы изучить влияние изменений экспрессии E-кадгерина на свойства клеток аденокарциномы толстой кишки человека и его роль в формировании фенотипа РСК, мы создали сублинии клеток HCT116

с повышенной и подавленной экспрессией E-кадгерина (*CDH1*). Для создания сублинии с гиперэкспрессией *CDH1* последовательность гена *CDH1* человека была клонирована в лентивирусный вектор pLenti6, содержащий CMV-промотор, обеспечивающий постоянную экспрессию целевого гена, и ген устойчивости к бластицидину для селекции инфицированных клеток (рис. 1а). Последовательности малых интерферирующих РНК к мРНК гена *CDH1* человека были клонированы в лентивирусный вектор pLKO.1, экспрессия которого стабильно подавляла продукцию E-кадгерина в клетках HCT116. Мы отметили, что клетки с подавленной экспрессией E-кадгерина утрачивали часть эпителиальных и приобретали некоторые мезенхимальные черты: наблюдалось ослабление межклеточных контактов, уменьшение количества β -катенина (см. рис. 1а) и его частичная транслокация в ядро (рис. 1б). Клетки приобретали веретеновидную форму и повышенную миграционную активность (рис. 1в). Сублиния клеток с гиперэкспрессией E-кадгерина и контрольная линия сохраняли исходный фенотип при более выраженных межклеточных контактах в клетках с повышенной экспрессией E-кадгерина. Таким образом, мы предположили, что клетки с подавленной экспрессией E-кадгерина могли приобретать некоторые черты ЭМП. Известно, что утрата экспрессии E-кадгерина (в результате мутаций, репрессии транскрипции и т. д.) трансформированными клетками приводит к прохождению ЭМП [25]. Ранее на модели аденокарциномы поджелудочной железы было показано, что переход между неинвазивной аденомой и инвазивной карциномой ассоциирован с утратой экспрессии E-кадгерина и прохождением ЭМП, кроме того, было показано, что утрата мембранного β -катенина коррелировала с инвазивным фенотипом и агрессивным течением некоторых типов колоректального рака [25, 26].

Поскольку мы наблюдали транслокацию β -катенина в ядро при подавлении экспрессии E-кадгерина, мы проверили, будет ли при этом активироваться сигнальный путь Wnt/ β -катенин. Во-первых, мы обнаружили многократное увеличение экспрессии *Wnt1*, а также одного из эффекторов данного сигнального каскада — онкогена *c-Myc* (рис. 1з). Во-вторых, с помощью люциферазного анализа TCF/Lef-репортера мы показали, что подавление E-кадгерина при экспрессии sh*CDH1* действительно приводит к увеличению TCF/Lef-зависимой транскрипционной активности (рис. 1д) и активации сигнального каскада Wnt/ β -катенин в клетках HCT116.

Известно, что данный сигнальный каскад может регулировать плюрипотентность стволовых клеток в ходе развития, мы проанализировали уровни мРНК некоторых генов плюрипотентности. Мы отметили

повышенную экспрессию генов *Hes1*, *OCT3/4*, *SOX2* в сублинии клеток HCT116 с подавленным E-кадгеринном (рис. 2). Полагаем, что утрата экспрессии E-кадгерина может способствовать повышению экспрессии транскрипционных факторов *OCT3/4* и *SOX2*, отвечающих за поддержание состояния «стволовости», что, в свою очередь, приводит к приобретению свойств РСК. Так, в работе N. Oshima и соавт. показано, что, если в клетках карциномы толстой кишки гиперэкспрессировать транскрипционные факторы *OCT3/4*, *SOX2* и *KLF4*, такие клетки приобретут свойства РСК [27]. Более того, в ряде исследований показано, что экспрессия генов *SOX2* и *OCT3/4* ассоциируется с более агрессивным фенотипом опухоли и неблагоприятным прогнозом как для злокачественных опухолей толстой кишки и желудка, так и для злокачественных опухолей других локализаций [28–30].

Принимая во внимание, что повышенная экспрессия данных генов характерна не только для «нормальных» стволовых клеток, но и для РСК, мы решили проверить, как изменения экспрессии E-кадгерина будут влиять на долю клеток со свойствами РСК в популяции HCT116 (рис. 3). Для этого мы провели ряд тестов, считающихся «золотым стандартом» для выявления РСК. Сначала мы проверили активность ABC-транспортеров в сублиниях HCT116 с повышенной и пониженной экспрессией E-кадгерина, для чего изучили содержание в клетках красителя Rhodamine 123 с помощью проточного цитофлуориметра. Согласно современным представлениям РСК являются основной причиной устойчивости опухолей к химиотерапии за счет феномена, названного множественной лекарственной устойчивостью, причина которого, в свою очередь, заключается в повышенной активности ABC-транспортеров [31], являющейся важнейшей характеристикой РСК. Мы показали, что количество неокрашенных клеток было в 1,8 раза выше в сублинии с пониженной экспрессией и в 1,6 раза ниже в сублинии с повышенной экспрессией E-кадгерина (рис. 3а).

Способность расти в неприкрепленных условиях является еще одним важным свойством РСК, используемым в некоторых работах для получения популяции, обогащенной РСК [32], поэтому мы протестировали способность полученных нами сублиний HCT116 формировать колонии в полужидкой среде. Клетки с подавленной экспрессией E-кадгерина формировали в 2,5 раза большее число колоний по сравнению с контрольной сублинией (рис. 3б), а количество колоний, сформированных клетками с увеличенной экспрессией E-кадгерина, было меньше. Главным свойством, позволяющим считать опухолевую клетку РСК, является способность этой клетки формировать новую опухоль при инъекции животному с иммунодефици-

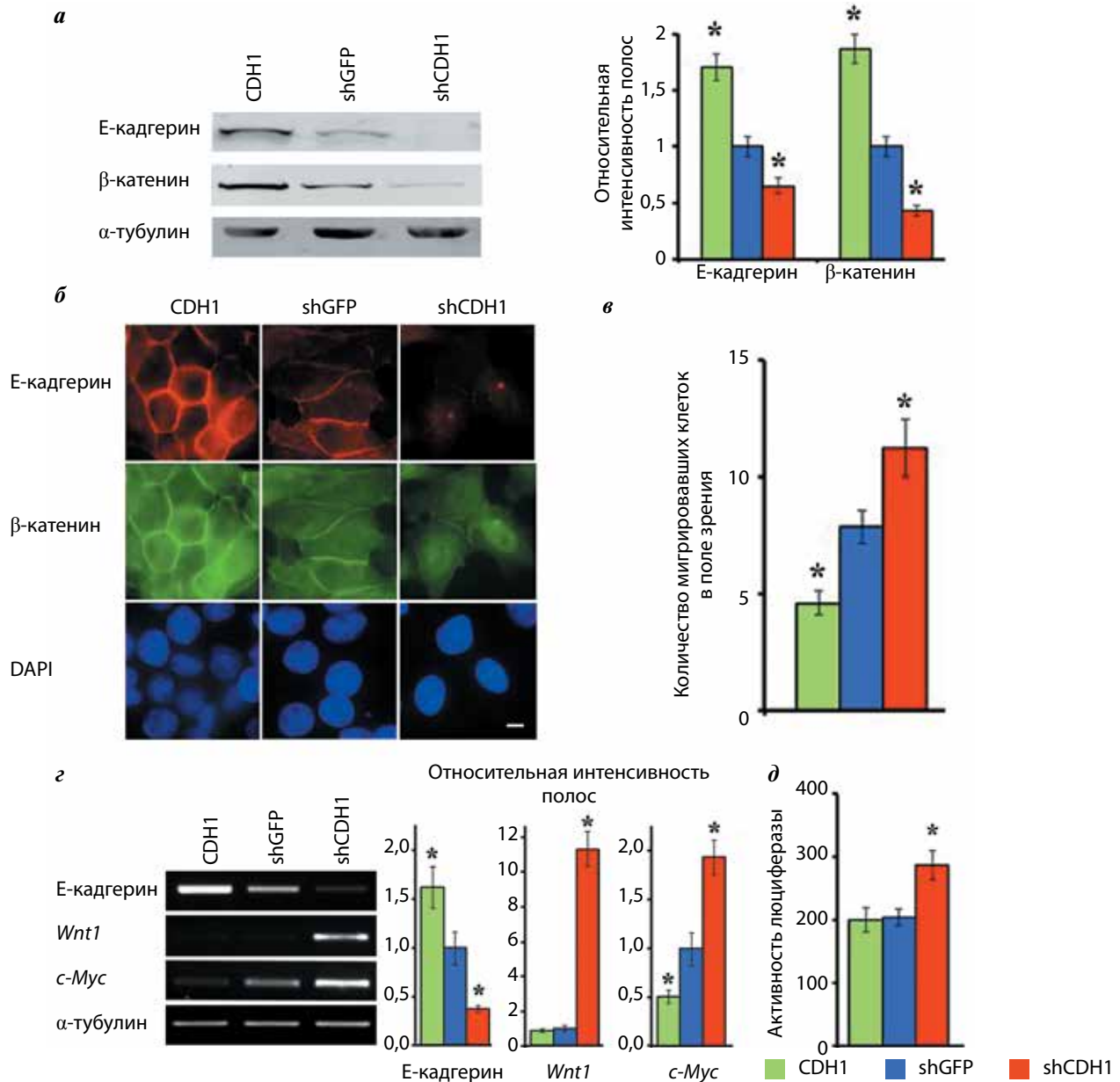


Рис. 1. Влияние изменения экспрессии *E*-кадгерина на морфологические характеристики и активацию сигнального каскада *Wnt*/β-катенин в клетках *HCT116*: **а** – вестерн-блот-анализ экспрессии *E*-кадгерина и β-катенина, α-тубулин использован для контроля количества нанесенных образцов. Слева представлены репрезентативные блоты, справа – относительная интенсивность полос; **б** – иммунофлуоресцентное окрашивание сублиний *HCT116* антителами к *E*-кадгерину и β-катенину. Отрезок – 5 мкм; **в** – миграционная активность сублиний *HCT116* в камере Бойдена; **г** – анализ экспрессии генов *Wnt1* и *с-Мус*. Слева – результаты одного из репрезентативных анализов полимеразной цепной реакции; α-тубулин использован для контроля количества нанесенных образцов. Справа – количественный анализ экспрессии генов; **д** – активность люциферазы в сублиниях *HCT116* с введенной репортерной конструкцией, экспрессирующей ген люциферазы под контролем промотора *TCF/Lef*. Различия между значениями контрольной (*shGFP*) и экспериментальных групп, достоверные по критерию Стьюдента ($p \leq 0,05$), отмечены звездочкой

том. Для того чтобы оценить туморогенность полученных сублиний *HCT116*, мы определяли минимальную прививочную дозу, вызывающую подкожный рост новой опухоли у бестимульных мышей. Оказалось, что минимальная прививочная доза для линии с повышенной экспрессией *E*-кадгерина была выше, а для сублинии с подавленным *E*-кадгеринном – ниже по сравнению с контрольной линией (см. таблицу). Проведенные

эксперименты указывают на то, что доля РСК в популяции клеток аденокарциномы толстой кишки человека *HCT116* зависит от уровня экспрессии *E*-кадгерина.

Параллельно с оценкой туморогенности сублиний *HCT116* мы исследовали скорость роста их ксенографтов. Оказалось, что как увеличение, так и подавление *E*-кадгерина приводит к торможению опухолевого роста (рис. 4б). Такой эффект объясняется,

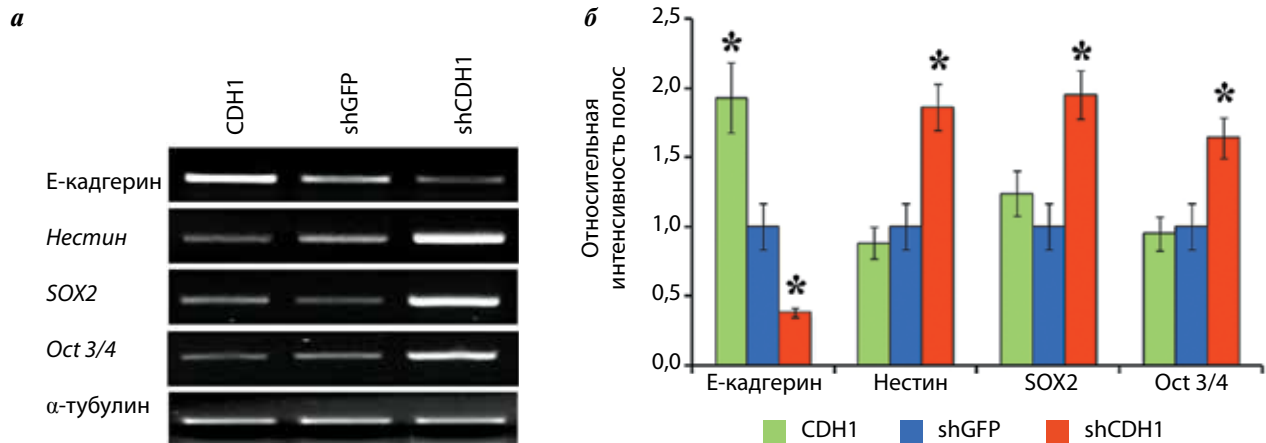


Рис. 2. Влияние изменения экспрессии *E*-кадгерина на экспрессию генов плюрипотентности в клетках *HCT116*. *a* – результаты одного из репрезентативных анализов полимеразной цепной реакции; α -тубулин использован для контроля количества нанесенных образцов. *б* – количественный анализ экспрессии генов. Различия между значениями контрольной (*shGFP*) и экспериментальных групп, достоверные по критерию Стьюдента ($p \leq 0,05$), отмечены звездочкой

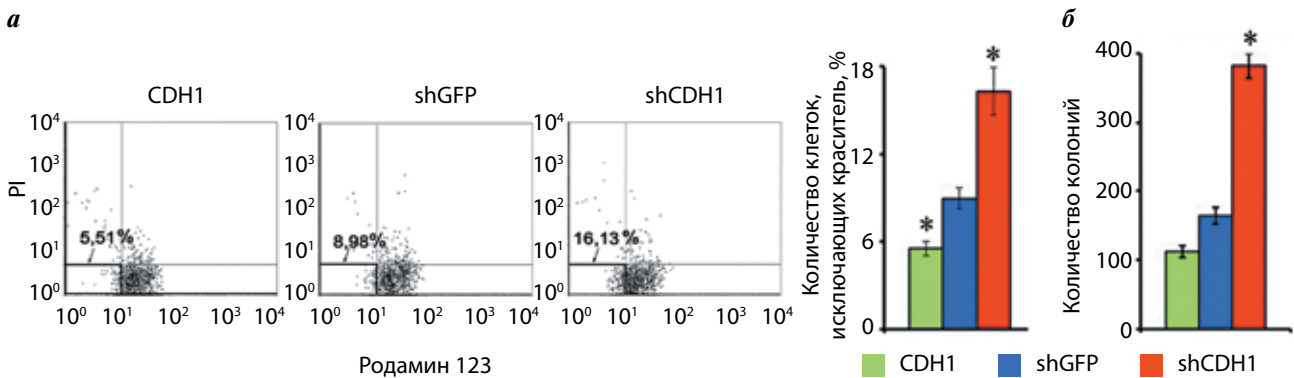


Рис. 3. Влияние изменения экспрессии *E*-кадгерина на долю клеток со свойствами РСК в линии *HCT116*: *a* – активность АВС-транспортеров. Слева – гистограммы проточной цитометрии (нижний левый квадрант – живые клетки, исключающие краситель Rhodamine 123). Двойная окраска: Rho123 – Rhodamine 123, PI – пропидий йодид. Справа – количественный анализ доли клеток, исключающих краситель; *б* – количественный анализ клоногенной активности клеток *HCT116*. Различия между значениями контрольной (*shGFP*) и экспериментальных групп, достоверные по критерию Стьюдента ($p \leq 0,05$), отмечены звездочкой

Влияние изменения экспрессии *E*-кадгерина на минимальную прививочную дозу клеток *HCT116*

Сублиния <i>HCT116</i>	Прививаемость, %			
	2×10^6	1×10^6	$0,5 \times 10^6$	$0,25 \times 10^6$
CDH1	100	75	40	0
shGFP	100	80	50	0
shCDH1	100	100	100	0

во-первых, замедленной пролиферацией *in vitro* клеток *HCT116* с измененной экспрессией *E*-кадгерина (рис. 4а) и, во-вторых, сниженной плотностью кровеносных капилляров в ксенографтах (рис. 4б), так как васкуляризация является одним из лимитирующих факторов роста опухоли. Плотность капилляров (CD34⁺-структур) в ксенографтах *HCT116* составляла $2,8 \pm 0,4$ на п. з., а при изменении экспрессии *E*-кадгерина уменьшалась до $1,5 \pm 0,3$.

Таким образом, подавление *E*-кадгерина в клетках *HCT116* стимулирует опухолевую прогрессию за счет индукции ЭМП, приобретения клетками свойств РСК и поддержания их доли в популяции, но не за счет пролиферативной активности клеток и их способности индуцировать васкуляризацию опухолевой ткани. Однако ранее нами было показано, что пониженная экспрессия *E*-кадгерина в клетках линии аденокарциномы легкого человека A549 способствует не только

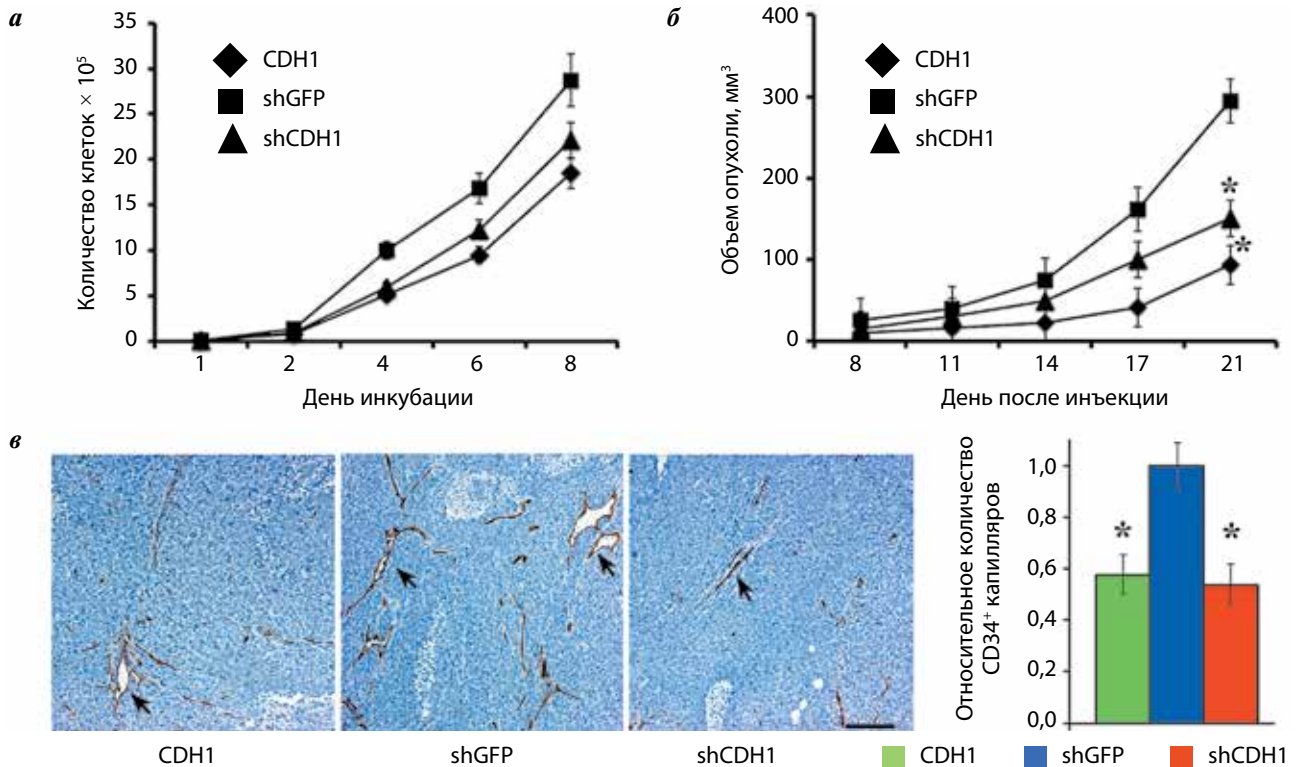


Рис. 4. Влияние изменения экспрессии E-кадгерина на скорость роста клеток HCT116 *in vitro* и *in vivo* и васкуляризацию ксенографтов: а – кинетика роста клеток *in vitro*. Каждая точка – средние величины для 3 лунок; представлены типичные данные одного из 3 экспериментов; б – кинетика роста подкожных ксенографтов после прививки бестимусным мышам. Приведены типичные данные, полученные при анализе 8–12 опухолей в каждом из 3 экспериментов; в – васкуляризация ксенографтов HCT116 с измененной экспрессией E-кадгерина. Слева – ИГХ-окрашивание срезов ксенографтов на CD34. Представлены типичные п. з. для каждой экспериментальной группы. Стрелками показаны CD34⁺ капилляры ≥ 100 мкм. Отрезок – 5 мкм. Справа – количественный анализ CD34⁺ капилляров длиной ≥ 100 мкм. Для каждой экспериментальной группы проанализировано не менее 25 п. з. Различия между значениями контрольной (shGFP) и экспериментальных групп, достоверные по критерию Стьюдента ($p \leq 0,05$), отмечены звездочкой

приобретению ими свойств РСК, но и увеличению скорости роста *in vivo* и способности стимулировать ангиогенез в опухоли [20]. По-видимому, такое различие во влиянии E-кадгерина на ростовые характеристики неопластических клеток разного гистогенетического типа имеет различные механизмы, что требует дальнейшего изучения.

Заключение

Итак, полученные результаты показывают, что подавление экспрессии E-кадгерина приводит к активации сигнального пути Wnt/ β -катенин, что, с одной стороны, индуцирует ЭМП и может способствовать приобретению клетками свойств РСК. С другой стороны, активация сигнального пути Wnt/ β -катенин увеличивает экс-

прессию генов плюрипотентности и также может способствовать приобретению трансформированными клетками черт РСК. Таким образом, утрата E-кадгерина может поддерживать долю РСК в популяции клеток аденокарциномы толстой кишки и может быть одним из механизмов перехода трансформированной клетки в «стволовое» состояние. Поскольку именно РСК являются основной причиной рецидивирования и метастазирования злокачественных опухолей, представляется перспективной разработка терапевтических подходов, способных восстанавливать экспрессию E-кадгерина и функциональные межклеточные контакты.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение № 14-15-00467).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Stemmler M.P. Cadherins in development and cancer. *Molecular Biosystems* 2008;4(8):835–50. <http://dx.doi.org/10.1039/b719215k>. PMID: 18633485.

2. van Roy F., Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and Molecular Life Science* 2008;65(23):3756–88.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00018-008-8281-1>. PMID: 18726070.

3. Rodriguez F.J., Lewis-Tuffin L.J., Anastasiadis P.Z. E-cadherin's dark side:

- possible role in tumor progression. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012;1826(1):23–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.03.002>. PMID: 22440943.
4. Perl A.K., Wilgenbus P., Dahl U. et al. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 2009;392(6672):190–3. PMID: 9515965.
5. Kim S.A., Inamura K., Yamauchi M. et al. Loss of CDH1 (E-cadherin) expression is associated with infiltrative tumor growth and lymph node metastasis. *British Journal of Cancer* 2016; 114(2):199–206. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2015.347>. PMID: 26742007.
6. Spaderna S., Schmalhofer O., Hlubek F. et al. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions during cancer progression. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 2007;91:21–8. PMID: 18314592.
7. Фармаковская М.Д., Хромова Н.В., Рыбко В.А., Копнин П.Б. Роль эпителиально-мезенхимального перехода в регуляции свойств раковых стволовых клеток солидных опухолей. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;4:3–8.
8. Mani S.A., Guo W., Liao M.J. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133(4):704–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>. PMID: 18485877.
9. Polyak K., Weinberg R.A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews Cancer* 2009;9(4):265–73. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2620>. PMID: 19262571.
10. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414(6859):105–11. <http://dx.doi.org/10.1038/35102167>. PMID: 11689955.
11. Scheel C., Weinberg R.A. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Seminars in Cancer Biology* 2012;22(5–6):396–403. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.04.001>. PMID: 22554795.
12. Kozovska Z., Gabrisova V., Kucerova L. Colon cancer: cancer stem cells markers, drug resistance and treatment. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2014; 68(8):911–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2014.10.019>. PMID: 25458789.
13. Singh A., Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 2010;29(34):4741–51. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2010.215>. PMID: 20531305.
14. Gupta P.B., Fillmore C.M., Jiang G. et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* 2011;146(4):633–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.026>. PMID: 21854987.
15. Chaffer C.L., Brueckmann I., Scheel C. et al. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108(19):7950–5. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1102454108>. PMID: 21498687.
16. Cordenonsi M., Zanconato F., Azzolin L. et al. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* 2011;147(4):759–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.048>. PMID: 22078877.
17. Cai C., Zhu X. The Wnt/b-catenin pathway regulates self-renewal of cancer stem-like cells in human gastric cancer. *Molecular Medicine Reports* 2012;5(5):1191–6. PMID: 22367735.
18. Liu S., Dontu G., Mantle I.D. et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Research* 2006;66(12):6063–71. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0054>. PMID: 16778178.
19. Korkaya H., Paulson A., Charafe-Jauffret E. et al. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling. *PLoS Biology* 2009;7(6):e1000121. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000121>. PMID: 19492080.
20. Farmakovskaya M., Khromova N., Rybko V. et al. E-cadherin repression increases amount of cancer stem cells in human A549 lung adenocarcinoma and stimulates tumor growth. *Cell Cycle* 2016;15(8):1084–92. <http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2016.1156268>. PMID: 26940223.
21. Bae K.M., Su Z., Frye C. et al. Expression of pluripotent stem cell reprogramming factors by prostate tumor initiating cells. *Journal of Urology* 2010; 183(5):2045–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2009.12.092>. PMID: 20303530.
22. Khromova N., Kopnin P., Rybko V., Kopnin B.P. Downregulation of VEGF-C expression in lung and colon cancer cells decelerates tumor growth and inhibits metastasis via multiple mechanisms. *Oncogene* 2012;31(11):1389–97. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.330>. PMID: 21804602.
23. Chitaev N.A., Troyanovsky S.M. Adhesive but not lateral E-cadherin complexes require calcium and catenins for their formation. *The Journal of Cell Biology* 1998;142(3):837–46. PMID: 9700170.
24. Logunov D.Y., Ilyinskaya G.V., Cherenova L.V. et al. Restoration of p53 tumor-suppressor activity in human tumor cells *in vitro* and in their xenografts *in vivo* by recombinant avian adenovirus CELO-p53. *Gene Therapy* 2004;11:79–84. PMID: 14681700.
25. Steinestel K., Eder S., Schrader A.J., Steinestel J. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition. *Clinical and Translational Medicine* 2014;3:17. <http://dx.doi.org/10.1186/2001-1326-3-17>. PMID: 25050175.
26. Kevans D., Wang L.M., Sheahan K. et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) protein expression in a cohort of stage II colorectal cancer patients with characterized tumor budding and mismatch repair protein status. *International Journal of Surgical Pathology* 2011;19(6):751–60. <http://dx.doi.org/10.1177/1066896911414566>. PMID: 21791486.
27. Oshima N., Yamada Y., Nagayama S. et al. Induction of cancer stem cell properties in colon cancer cells by defined factors. *PLoS One* 2014;9(7):e101735. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0101735>. PMID: 25006808.
28. Zhang X., Hua R., Wang X. et al. Identification of stem-like cells and clinical significance of candidate stem cell markers in gastric cancer. *Oncotarget* 2016; 7(9):9815–31. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.6890>. PMID: 26769843.
29. Talebi A., Kianersi K., Beiraghdar M. Comparison of gene expression of SOX2 and OCT4 in normal tissue, polyps, and colon adenocarcinoma using immunohistochemical staining. *Advanced Biomedical Research* 2015;4:234. <http://dx.doi.org/10.4103/2277-9175.167958>. PMID: 26645019.
30. Habu N., Imanishi Y., Kameyama K. et al. Expression of Oct3/4 and Nanog in the head and neck squamous carcinoma cells and its clinical implications for delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2015;15:730. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-015-1732-9>. PMID: 26483189.
31. Alisi A., Cho W.C., Locatelli F., Fruci D. Multidrug resistance and cancer stem cells in neuroblastoma and hepatoblastoma. *International Journal of Molecular Science* 2013;14(12):24706–25; <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-015-1732-9>. PMID: 26483189.
32. Singh S.K., Clarke I.D., Terasaki M. et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumours. *Cancer Research* 2003;63(18):5821–8; PMID: 14522905.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РАЗНЫХ ТИПОВ СОСУДОВ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Н.В. Никитенко¹, М.А. Сеньчукова², О.Н. Томчук², Н.В. Зайцев³, А.А. Стадников²,
С.О. Митряков³, А.М. Дегтярев¹, Д.В. Киртбая¹

¹ ГБУЗ «Онкологический диспансер № 2» Минздрава Краснодарского края; Россия, 354392,
Сочи, п. Красная поляна, ул. Аишхо, 21;

² ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России;
Россия, 460000, Оренбург, ул. Советская, 6;

³ ГБУЗ «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер»;
Россия, 460021, Оренбург, пр-т Гагарина, 11

Контакты: Наталья Викторовна Никитенко natali.nikitenko.87@mail.ru

Цель исследования – изучение морфологии опухолевых сосудов и ее связи с клинико-морфологическими характеристиками и рецепторным статусом новообразования при раке молочной железы (РМЖ).

Материалы и методы. Образцы опухолей 66 пациенток с T1–2 стадиями инвазивного РМЖ неспецифического типа окрашивали гематоксилином Майера и эозином, а также иммуногистохимическим методом с использованием антител к CD34.

Результаты. Проведенное исследование позволило выделить следующие типы опухолевых сосудов: обычные капилляры, дилатированные капилляры (ДК) перитуморальной стромы и атипичные дилатированные капилляры (АДК) интратуморальной стромы, характеризующиеся хаотичным расположением клеток эндотелиальной выстилки. Количество ДК в перитуморальной строме коррелировало с выраженностью лимфоидной инфильтрации стромы опухоли ($p = 0,0001$), количеством АДК ($p = 0,0001$) и наличием опухолевых эмболов в сосудах ($p = 0,02$); количество АДК – с отрицательным статусом рецепторов эстрогенов ($p = 0,008$) и прогестерона ($p = 0,043$) и наличием опухолевых эмболов в сосудах ($p = 0,001$).

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о неоднородности сосудов по морфологии и клинической значимости при РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, морфология сосудов опухоли, факторы прогноза

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-15-22

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC AND CLINICAL VALUE OF DIFFERENT TYPES OF TUMOR VESSELS IN BREAST CANCER

N. V. Nikitenko¹, M. A. Senchukova², O. N. Tomchuk², N. V. Zaitsev³, A. A. Stadnikov²,
S. O. Mitriakov³, A. M. Degtiarev¹, D. V. Kirtbaia¹

¹ City Oncology Clinic, No 2, Krasnodar Region; 21 Aishkho St., Krasnaya Polyana, Sochi, 354392, Russia;

² Orenburg State Medical University; 6 Sovetskaya St., Orenburg, 460000, Russia;

³ Orenburg Regional Clinical Oncology Center; 11 Prospect Gagarina, Orenburg, 460021, Russia

Objective. To study the morphology of tumor vessels and their relationship with the clinical and morphological characteristics of breast cancer (BC) was the purpose of this research.

Materials and methods. The tumor samples obtained from 66 patients with T1–T2 stages of invasive BC carcinoma of the unspecific type were stained with Mayer's hematoxylin and eosin and immunohistochemistry using antibodies to CD34.

Results. In the samples there were revealed the following types of tumor vessels: the normal capillaries, the dilated capillaries (DC) of the peritumoral stroma and the abnormal dilated capillaries (ADC) of the intratumoral stroma with a chaotic arrangement of the endothelial cells. The number of DC in the peritumoral stroma have been correlated with the severity of the tumor stroma lymphoid infiltration ($p = 0,0001$), with the number of ADC ($p = 0,0001$) and with the presence of tumor emboli in blood vessels ($p = 0,02$). The number of ADC – with the negative status of estrogen ($p = 0,008$) and progesterone ($p = 0,043$) receptors and with the presence of tumor emboli in vessels ($p = 0,001$).

Conclusion. These data suggest that the tumor vessels in BC are heterogeneous in morphology and clinical significance.

Key words: breast cancer, morphology of tumor vessels, prognostic factors

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является основной причиной смерти женщин от злокачественных новообразований. Разнообразные клинические, морфологические, молекулярно-биологические и молекулярно-генетические факторы влияют на поведение опухолевых клеток и их ответ на проводимое лечение. К таким факторам относят возраст пациенток, гистологический тип и степень дифференцировки опухоли, размеры опухоли, наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах, статус рецепторов к эстрогенам (РЭ), прогестерону (РП) и фактору роста эндотелия сосудов (VEGF) 2-го типа (HER-2) [1–3]. Не менее важная роль в опухолевой прогрессии отводится ангиогенезу, фактору, непосредственно связанному с ростом и метастазированием злокачественных новообразований [4]. Определение его активности при злокачественных новообразованиях имеет большое значение как для оценки прогноза заболевания, так и для планирования лечения. Однако следует отметить, что у пациенток, страдающих РМЖ, при исследовании активности ангиогенеза были получены довольно противоречивые результаты. В ряде исследований отмечено, что гиперэкспрессия VEGF, высокая плотность кровеносных и лимфатических сосудов в опухоли и перитуморальной строме связаны с более распространенными стадиями и ухудшением отдаленных результатов лечения РМЖ [5–8]. Другие авторы не обнаружили связи плотности микрососудов (ПМС) в опухоли с клиническими характеристиками и отдаленными результатами лечения РМЖ [9, 10]. В исследовании С.А. Sullivan и соавт. [11] установлено наличие прогностической ценности лишь определенных маркеров, например CD31, и показано ее отсутствие у других, например у CD34 и VIII фактора, а в работе О. Fernández-Guinea и соавт. [12] даже отмечены отрицательные корреляции между ПМС и наличием отдаленных метастазов. Полагаем, что отмеченные противоречия могут быть связаны с тем фактом, что сосуды в опухоли гетерогенны и отличаются как по морфологии, так и по клинической значимости [13–16].

Цель исследования – изучение морфологии опухолевых сосудов и ее связи с клинико-морфологическими характеристиками и рецепторным статусом новообразования при РМЖ.

Материалы и методы

В исследование были включены образцы опухолей 66 пациенток с T1–2 стадиями инвазивного РМЖ неспецифического типа, радикально оперированных в Оренбургском областном клиническом онкологическом диспансере (ОКОД) в период с мая 2011 г. по апрель 2013 г. Клинико-патологические данные представлены в табл. 1.

Таблица 1. Клинико-патологическая характеристика данных пациенток, страдающих раком молочной железы

Клинико-патологические данные	n	%
T		
pT1	27	40,9
pT2	39	59,1
N		
pN0	37	56,1
pN1	15	22,7
pN2	1	1,5
pN3	13	19,7
Степень дифференцировки опухоли		
G ₁	8	12,1
G ₂	46	69,7
G ₃	12	18,2
Статус РЭ		
Отрицательный	45	68,2
Положительный	31	31,8
Статус РП		
Отрицательный	38	64,4
Положительный	21	35,6
Статус HER-2/neu		
Отрицательный	53	80,3
Положительный	13	19,7

Примечание. РЭ – рецепторы к эстрогенам, РП – рецепторы к прогестерону, HER-2/neu – рецепторы к фактору роста эндотелия сосудов 2-го типа.

Средний возраст пациенток составил $57,9 \pm 9,9$ года (35–86 лет, медиана 57 лет). Радикальная мастэктомия была выполнена в 51 (77,3 %) случае, радикальная резекция молочной железы – в 15 (22,7 %). После операции лучевая терапия на зоны регионарного метастазирования была выполнена 36 (54,6 %) пациенткам, адъювантная химиотерапия проведена 42 (63,6 %). В исследование не включали пациенток, получавших предоперационную лучевую или неоадъювантную химиотерапию. Медиана периода наблюдения за пациентками составила 58,1 мес.

Забор материала для исследования осуществляли в течение 30 мин после удаления операционного препарата. Полученные образцы помещали в формалин pH 7,0, проводили фиксацию по стандартной методике и заливали в парафин. Срезы толщиной 3–4 мкм окрашивали гематоксилином Майера и эозином

и иммуногистохимическим методом (ИГХ) с использованием антител к CD34 (QB-END/10, Novocastra Laboratories Ltd.) в разведении 1:50. ИГХ-анализ выполняли на базе ИГХ-лаборатории Оренбургского ОКОД, оснащенного роботизированной системой Autostainer 480. Всего с использованием ИГХ было исследовано 53 гистопрепарата. Срезы толщиной 4 мкм наносили на высокоадгезивные стекла и высушивали при температуре 37 °С в течение 18 ч. Исследования проводили в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя. В качестве системы визуализации применяли UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen. В качестве отрицательного контроля срезы аналогичным образом инкубировали с раствором для разведения антител (UltrAb Diluent). Препараты изучали с помощью микроскопа Optika B-350 (Optika, Италия) с использованием видеокамеры Digital Camera for Microscope (DCM500).

Первоначально образцы, окрашенные гематоксилином Майера и эозин, исследовались при малом ($\times 100$) увеличении для определения перитуморальных областей. В соответствии с этим сосуды, расположенные в ткани опухоли, определяли как интратуморальные. Сосуды, расположенные за пределами опухоли, но в пределах 2 мм от ее края, — как перитуморальные.

В зависимости от морфологических особенностей опухолевые сосуды разделились на 3 группы:

- обычные капилляры (капилляры диаметром 5–40 мкм с обычной морфологией);
- дилатированные капилляры (ДК) перитуморальной стромы (сосуды диаметром более 40 мкм с обычным строением эндотелиальной выстилки);
- атипичные дилатированные капилляры (АДК) интратуморальной стромы (сосуды диаметром

более 40 мкм с хаотичным расположением эндотелиальных клеток).

Образцы исследовали сначала при увеличении $\times 100$ и $\times 200$, выявляли по 5 участков в перитуморальной строме с максимальной васкуляризацией сосудов («горячие точки») и затем при увеличении $\times 400$ выполняли снимки выбранных объектов (рис. 1). Плотность микрососудов (ПМС), представленных обычными капиллярами, оценивали в точках максимальной васкуляризации на площади $0,30 \times 0,22 \text{ мм}^2$, принятой за условную единицу площади (УЕП), путем подсчета среднего количества капилляров и отдельных клеток, экспрессирующих CD34 [17]. Подсчет ПМС проводили с использованием программы Adobe Photoshop CS5 и наложением на изображение метрической сетки плотностью 140 точек. Количество ДК и АДК оценивали полуколичественным способом при увеличении $\times 200$ (нет; единичные — не более 2 сосудов в поле зрения; множественные — более 2 в поле зрения). Для деления сосудов на единичные и множественные был использован 35-й перцентиль, определенный путем подсчета количества сосудов на УЕП в 20 исследованных образцах. Наличие лимфоидной инфильтрации стромы опухоли оценивали визуально-аналоговым способом (нет, диффузная инфильтрация, очаговые инфильтраты). Статистический анализ выполняли с использованием программы Statistica 6.0. ПМС определяли как $M \pm \sigma$. Взаимосвязь между различными показателями устанавливали, используя непараметрические методы (ранговой корреляции по Спирмену и гамма). Достоверность различий частот признаков в изучаемых группах оценивали с помощью критерия χ^2 . Анализ общей и безрецидивной 3-летней выживаемости выполняли по методу Каплана–Майера. Срав-

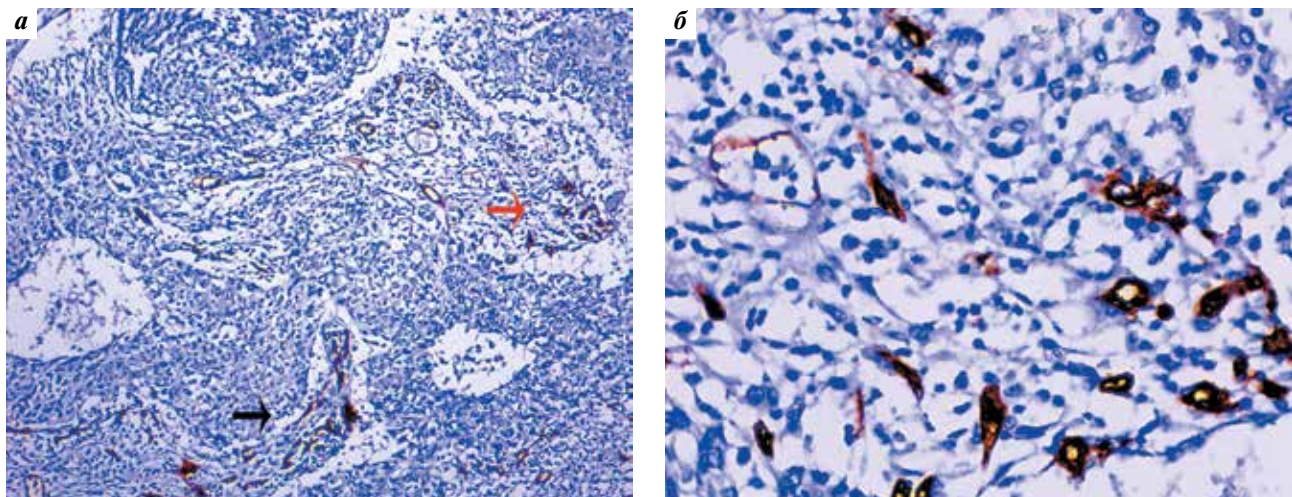


Рис. 1. Определение плотности микрососудов в образцах ткани рака молочной железы: а — малое увеличение ($\times 200$); стрелками отмечены области с максимальной васкуляризацией («горячие точки»). ИГХ-окраска с антителами к CD34 ($\times 200$); б — участок опухоли, отмеченный красной стрелкой на рис. 1а, выбранный для морфометрии. ИГХ-окраска с антителами к CD34 ($\times 400$)

нение показателей выживаемости между группами пациентов проводили с использованием *long-rank*-теста; $p < 0,05$ считали статистически значимым.

Результаты

Проведенное исследование свидетельствует о том, что сосуды в опухоли и прилежащих тканях неоднородны по своей морфологии и клинической значимости. Мы выделили следующие типы сосудов:

- Обычные капилляры перитуморальной и интратуморальной стромы. Капилляры диаметром 5–40 мкм имели обычное строение. Эндотелиальные клетки, выстилающие такие сосуды, имели плоские гиперхромные ядра. Их цитоплазма равномерно и интенсивно окрашивалась маркером CD34 и имела четкие контуры (рис. 2а). Такие сосуды встречались как в перитуморальной, так и в интратуморальной строме.
- ДК перитуморальной стромы. Такие сосуды диаметром более 40 мкм (средний диаметр 164 ± 88 мкм) имели правильную округлую или овальную форму. Ядра эндотелиальных клеток, выстилающих эти сосуды, часто были овальной формы с нежно сетчатой структурой хроматина (рис. 2б). Цитоплазма клеток довольно равномерно окрашивалась маркером и имела четкие контуры (рис. 2в). Сосуды данного типа встречались преимущественно в перитуморальной строме, и их наличие часто было связано с характерной структурой соединительно-тканного матрикса, представленного незрелой соединительной тканью, богатой фибробластами (рис. 2е).
- АДК интратуморальной стромы. Сосуды этого типа диаметром 40 мкм и более имели неправильную форму и выраженную атипичность выстилающих эндотелиальных клеток. Наиболее часто эти сосуды встречались в интратуморальной строме. Их характерной особенностью было хаотичное расположение эндотелиальных клеток, нередко вертикально ориентированных к просвету сосуда. Цитоплазма выстилающих эндотелиальных клеток неравномерно окрашивалась маркером CD34 и имела большое количество цитоплазматических отростков, вследствие чего контуры сосудов выглядели нечеткими (рис. 2д). В просвете АДК часто определялись опухолевые эмболы (рис. 2е) и CD34⁺ клетки, не связанные со стенкой сосудов. При анализе связи рассмотренных типов опухолевых сосудов с клиническими характеристиками РМЖ установлены следующие факты.

1. Обычные капилляры интратуморальной и перитуморальной стромы. ПМС в перитуморальной и интратуморальной строме составила $9,4 \pm 3,8$ и $9,9 \pm 3,0$ на УЕП соответственно. Связи ПМС в интратумо-

ральной и перитуморальной строме с клиническими характеристиками РМЖ не выявлено.

2. ДК перитуморальной стромы. Данные сосуды отсутствовали в 9,0 %, были единичными в 43,9 %, множественными – в 43,9 % случаев. Наличие ДК не было связано с клиническими характеристиками РМЖ. Количество ДК в перитуморальной строме коррелировало с выраженностью лимфоидной инфильтрации стромы опухоли ($\gamma = 0,489$, $p = 0,0001$), количеством АДК ($\gamma = 0,565$, $p = 0,0001$) и наличием опухолевых эмболов в сосудах ($\gamma = 0,396$, $p = 0,02$).

Наличие множественных ДК достоверно чаще наблюдали при наличии лимфоидных инфильтратов в строме опухоли (в 36,4; 21,1 и 68 % случаев соответственно при отсутствии лимфоидной инфильтрации стромы, диффузной и очаговой, $p = 0,03$).

При наличии множественных ДК в перитуморальной строме достоверно чаще выявлялись множественные АДК (табл. 2) и опухолевые эмболы в сосудах (табл. 3).

3. АДК. Наличие АДК было связано с содержанием РЭ ($\gamma = -0,567$, $p = 0,0003$) и РП ($\gamma = -0,381$, $p = 0,043$) в опухоли, наличием опухолевых эмболов в сосудах ($\gamma = 0,525$, $p = 0,001$).

Множественные АДК достоверно чаще встречались при отрицательном статусе РЭ (табл. 4) и более часто – при отрицательном статусе РП (табл. 5).

При множественных АДК достоверно чаще в сосудах выявлялись опухолевые эмболы (табл. 6).

Множественные АДК достоверно чаще встречались при трижды негативном РМЖ, чем при других биологических подтипах (в 18,2; 41,7 и 66,7 % случаев соответственно при люминальном А, люминальном В и трижды негативном РМЖ; $\chi^2 = 6,71$, $p = 0,03$). Связи ПМС и количества ДК с биологическими подтипами РМЖ не выявлено.

Мы оценили показатели 3-летней общей и безрецидивной выживаемости в зависимости от типов и количества сосудов опухоли. За период наблюдения у 7 пациенток возникли рецидивы РМЖ. Метастатическое поражение костей было выявлено у 4 женщин, метастазы в контралатеральные лимфатические узлы – у 1, метастазы в печень – у 1 и диссеминация в печень, легкие, кости – у 1 пациентки, которая умерла через 34,2 мес. после операции. В обследованной группе 3-летняя безрецидивная выживаемость достоверно коррелировала только со стадией N РМЖ ($\gamma = 0,987$, $p = 0,03$) и недостоверно – с наличием опухолевых эмболов в сосудах ($\gamma = 0,966$, $p = 0,07$). Трехлетняя безрецидивная выживаемость при N0, N1, N2 и N3 составила 94,4; 93,3; 100 и 76,9 % соответственно ($p = 0,04$ при сравнении выживаемости между N0 и N3), а общая выживаемость – 100, 100, 100 и 92,3 % соответственно. При наличии опухолевых эмболов в сосудах 3-летняя безрецидивная вы-

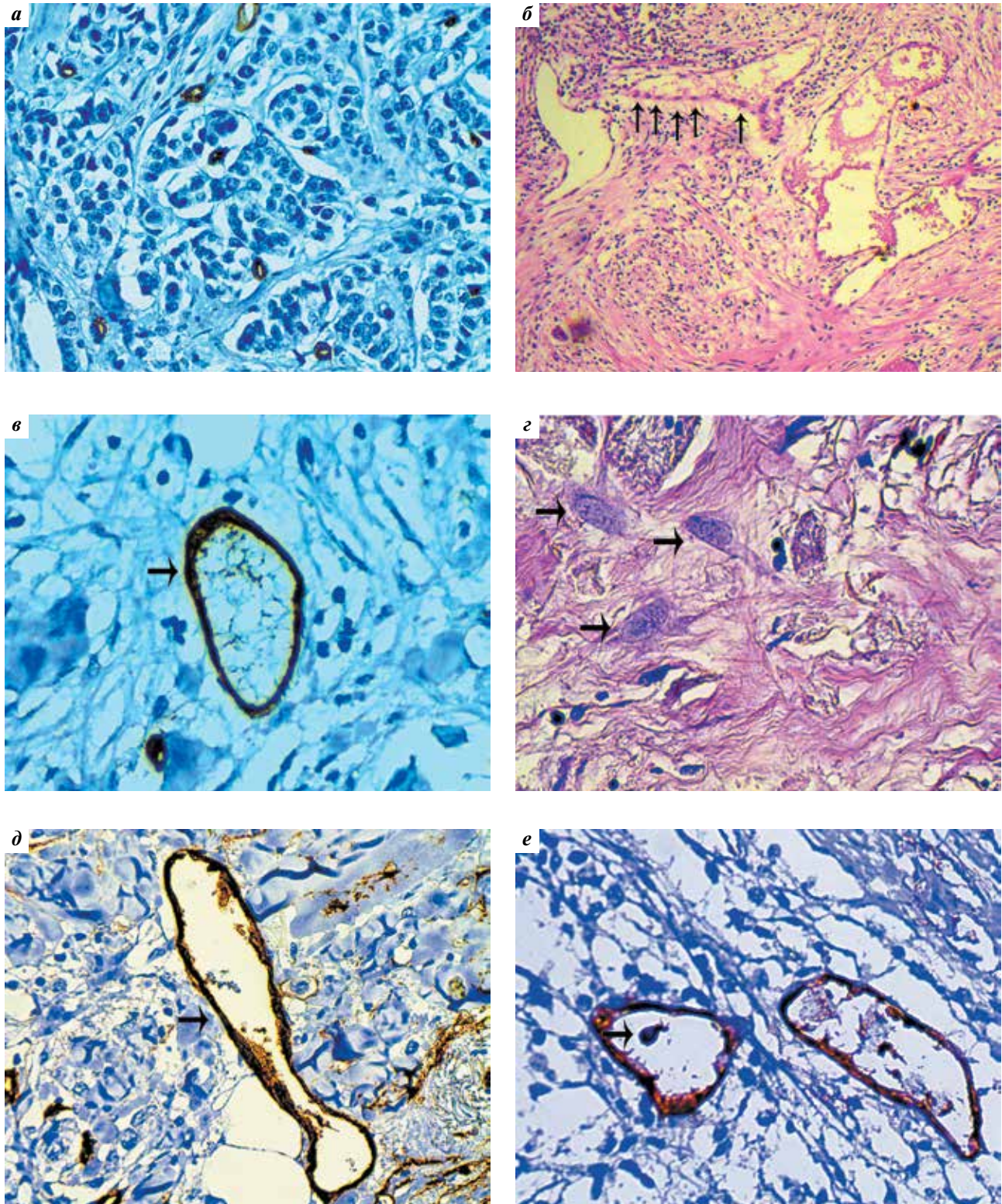


Рис. 2. Морфологические особенности опухолевых сосудов при раке молочной железы: а – обычные капилляры интратуморальной стромы. ИГХ-окраска с антителами к CD34 ($\times 400$); б – ДК перитуморальной стромы. Стрелками отмечены эндотелиальные клетки с крупными, овальной формы ядрами. Окраска гематоксилином Майера и эозином ($\times 200$); в – ДК перитуморальной стромы (стрелка). ИГХ-окраска с антителами к CD34 ($\times 400$); г – тонковолокнистая структура соединительно-тканного матрикса перитуморальной стромы с фибробластами (стрелки). Окраска гематоксилином Майера и эозином ($\times 600$); д – АДК в интратуморальной строме (стрелка). ИГХ-окраска с антителами к CD34 ($\times 400$); е – АДК в интратуморальной строме. В одном из сосудов виден опухолевый эмбол (стрелка). ИГХ-окраска с антителами к CD34 ($\times 400$)

Таблица 2. Количество атипичных дилатированных капилляров (АДК) в зависимости от количества дилатированных капилляров (ДК) в перитуморальной строме

АДК	ДК						Статистика
	Нет		Единичные		Множественные		
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Отсутствуют	2	33,3	7	29,2	1	4,3	$\chi^2 = 8,99;$ $p = 0,06$
Единичные	3	50,0	9	37,5	7	30,4	
Множественные	1	16,7	8	33,3	15	65,2	

Таблица 3. Наличие опухолевых эмболов в сосудах в зависимости от количества дилатированных капилляров (ДК) в перитуморальной строме

Опухолевые эмболы	ДК						Статистика
	Нет		Единичные		Множественные		
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Нет	3	50,0	12	50,0	6	26,1	$\chi^2 = 3,11;$ $p = 0,20$
Есть	3	50,0	12	50,0	17	73,9	

Таблица 4. Количество атипичных дилатированных капилляров (АДК) в зависимости от статуса рецепторов к эстрогенам (РЭ)

Статус РЭ	АДК						Статистика
	Нет		Единичные		Множественные		
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Отрицательный	3	10,0	9	30,0	18	60,0	$\chi^2 = 6,85;$ $p = 0,03$
Положительный	7	30,4	10	43,5	6	26,1	

Таблица 5. Количество атипичных дилатированных капилляров (АДК) в зависимости от статуса рецепторов к прогестерону (РП)

Статус РП	АДК						Статистика
	Нет		Единичные		Множественные		
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Отрицательный	7	17,1	13	31,7	21	51,2	$\chi^2 = 2,58,$ $p = 0,26$
Положительный	3	25,0	6	50,0	3	25,0	

живаемость составила 90,3 %, при отсутствии – 85,2 % ($p > 0,05$). Не отмечено корреляций между количеством ДК и АДК и выживаемостью пациенток с РМЖ.

Таблица 6. Наличие опухолевых эмболов в сосудах в зависимости от количества атипичных дилатированных капилляров (АДК)

Опухолевые эмболы	АДК						Статистика
	Нет		Единичные		Множественные		
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Нет	7	70,0	8	42,1	6	25,0	$\chi^2 = 6,05,$ $p = 0,047$
Есть	3	30,0	11	57,9	18	75,0	

Трехлетняя безрецидивная выживаемость при отсутствии ДК, при единичных и множественных ДК составила 100; 82,8 и 93,1 % соответственно ($p > 0,05$), а 3-летняя общая выживаемость – 100; 96,5 и 100 % соответственно ($p > 0,05$). В свою очередь, при отсутствии АДК, при единичных и множественных АДК 3-летняя безрецидивная выживаемость составила 100; 89,5 и 91,3 % соответственно ($p > 0,05$), а общая выживаемость – 100; 94,7 и 100 % соответственно ($p > 0,05$).

Обсуждение

Большое число исследований свидетельствует о том, что сосуды в опухоли неоднородны и отличаются по происхождению, морфологии, клинической значимости и чувствительности к антиангиогенной терапии [13, 14, 16, 18]. Рядом исследователей отмечено, что важное прогностическое значение могут иметь некоторые морфометрические особенности сосудов, такие как их размер, форма, равномерность, интенсивность окрашивания специфическими маркерами [15, 19–21]. Так, при РМЖ было показано, что диаметр и форма микрососудов связаны с гистологическим типом опухоли, наличием некротических участков, гормональным статусом, лимфоваскулярной инвазией и диссеминацией опухолевых клеток в костный мозг [15].

В настоящем исследовании мы изучали разные типы сосудов при РМЖ и их клиническую значимость. Полученные результаты позволили выделить следующие типы микрососудов, отличающиеся по морфологии и клинической значимости:

- обычные капилляры;
- ДК перитуморальной стромы;
- АДК.

Обычные капилляры были представлены сосудами диаметром 5–40 мкм. ПМС была абсолютно идентичной в пери- и интратуморальной строме. Связи сосудов этого типа с клиническими характеристиками РМЖ мы не выявили.

Довольно часто (91 % случаев) в перитуморальной строме наблюдались ДК диаметром 40 мкм и более. Отсутствие эритроцитов в их просвете свидетельствовало в пользу того факта, что эти сосуды

являлись лимфатическими, однако для более точного определения их происхождения необходимы дополнительные исследования с использованием специальных маркеров, например D2–40. Наличие ДК не было связано с клиническими характеристиками РМЖ, однако их количество положительно коррелировало с количеством АДК, выраженностью лимфоидной инфильтрации стромы опухоли и наличием опухолевых эмболов в сосудах.

Наибольший интерес представляли АДК, отличительной особенностью которых стал тот факт, что их эндотелиальная выстилка была представлена крупными клетками, беспорядочно ориентированными по отношению к стенке сосуда, иногда расположенными перпендикулярно к ней. Наличие АДК было связано со статусом РЭ ($p = 0,0003$) и РП ($p = 0,043$) и наличием опухолевых эмболов в сосудах ($p = 0,001$). Множественные АДК достоверно чаще встречались при отрицательном статусе РЭ ($p = 0,03$) и РП ($p = 0,26$), при трижды негативном РМЖ и достоверно реже — при люминальном А биологическом подтипе РМЖ. При наличии множественных АДК достоверно чаще в просвете кровеносных и лимфатических сосудов выявлялись опухолевые эмболы ($p = 0,047$). С учетом особенностей морфологии АДК и наличия CD34⁺

клеток в их просвете не исключено участие ангиобластов в образовании сосудов этого типа. Их вовлечение в формирование опухолевых сосудов отмечено многими исследователями [5, 14, 22–24].

Отсутствие достоверных корреляций между описанными сосудами и 3-летней выживаемостью пациентов, страдающих РМЖ, возможно, свидетельствует о том, что самые разнообразные факторы, без учета которых невозможно делать однозначные выводы, могут влиять на отдаленные результаты лечения.

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что сосуды в опухоли при РМЖ неоднородны по морфологии и клинической значимости. Наибольшее прогностическое значение отмечено для АДК. Их наличие положительно коррелировало с отрицательным статусом РЭ и РП и наличием опухолевых эмболов в сосудах. Полагаем, что полученные данные могут представлять не только теоретический, но и практический интерес. Считаем целесообразным дальнейшие исследования для изучения особенностей морфологии опухолевых сосудов и их связей с клиническими характеристиками и прогнозом РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Fitzgibbons P.L., Page D.L., Weaver D. et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med 2000;124(7):966–78. DOI: 10.1043/0003-9985(2000)124<0966: PFIBC>2.0. CO;2. PMID: 10888772.
2. ESMO Guidelines Working Group, Kalaja V.V. Recurrent or metastatic breast cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2007;18 Suppl 2: ii 9–11. DOI: 10.1093/annonc/mdm016. PMID: 17491064.
3. Lester S.C., Bose S., Chen Y.Y. et al. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. Arch Pathol Lab Med 2009;133(10):1515–38. DOI: 10.1043/1543-2165-133.10.1515. PMID: 19792042.
4. Folkman J. Is tissue mass regulated by vascular endothelial cells? Prostate as the first evidence. Endocrinology 1998;139(2):441–2. DOI: 10.1210/endo.139.2.5858. PMID: 9449608.
5. Han Z., Chen Z., Zheng R. et al. Clinicopathological significance of CD133 and CD44 expression in infiltrating ductal carcinoma and their relationship to angiogenesis. World J Surg Oncol 2015;13:56. DOI: 10.1186/s12957-015-0486-9. PMID: 25889325.
6. Gasparini G. Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer. Crit Rev Oncol Hematol 2001 Feb;37(2):97–114. PMID: 11166583.
7. Li Y.S., Kaneko M., Amatya V.J. et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C and its receptor in invasive micropapillary carcinoma of the breast. Pathol Int 2006;56(5):256–61. DOI: 10.1111/j.1440-1827.2006.01961.x. PMID: 16669874.
8. Popiela T.J., Sikora J., Klimek M. et al. The analysis of CD34 antigen immunoreactivity level in invasive ductal breast cancer with respect to the presence of lymph node metastases. Neuro Endocrinol Lett 2008;29(4):443–6. PMID: 18766141.
9. Fridman V., Humblet C., Bonjean K., Boniver J. Assessment of tumor angiogenesis in invasive breast carcinomas: absence of correlation with prognosis and pathological factors. Virchows Arch 2000;437(6):611–7. PMID: 11193472.
10. Mohammed Z.M., McMillan D.C., Edwards J. et al. The relationship between lymphovascular invasion and angiogenesis, hormone receptors, cell proliferation and survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. BMC Clin Pathol 2013;13(1):31. DOI: 10.1186/1472-6890-13-31. PMID: 24274633.
11. Sullivan C.A., Ghosh S., Ocal I.T. et al. Microvessel area using automated image analysis is reproducible and is associated with prognosis in breast cancer. Hum Pathol 2009;40(2):156–65. DOI: 10.1016/j.humpath.2008.07.005. PMID: 18799189.
12. Fernández-Guinea O., Álvarez-Cofiño A., Eiró N. et al. Low microvascular density at the tumor center is related to the expression of metalloproteases and their inhibitors and with the occurrence of distant metastasis in breast carcinomas. Int J Clin Oncol 2013;18(4):629–40. DOI: 10.1007/s10147-012-0428-2. PMID: 22688161.
13. Birau A., Ceausu R.A., Cimpean A.M. et al. Assessment of angiogenesis reveals blood vessel heterogeneity in lung carcinoma. Oncol Lett 2012;4(6):1183–6. DOI: 10.3892/ol.2012.893. PMID: 23205116.
14. Fukumura D., Duda D.G., Munn L.L. et al. Tumor microvasculature and microenvironment: novel insights through intravital imaging in pre-clinical models. Microcirculation 2010;17(3):206–25. DOI: 10.1111/j.1549-8719.2010.00029.x. PMID: 20374484.

15. Mikalsen L.T., Dhakal H.P., Bruland O.S. et al. The clinical impact of mean vessel size and solidity in breast carcinoma patients. *PLoS One* 2013;11;8(10):e75954. DOI: 10.1371/journal.pone.0075954. PMID: 24146798.
16. Nagy J.A., Dvorak H.F. Heterogeneity of the tumor vasculature: the need for new tumor blood vessel type-specific targets. *Clin Exp Metastasis* 2012;29(7):657–62. DOI: 10.1007/s10585-012-9500-6. PMID: 22692562.
17. Weidner N., Semple J.P., Welch W.R., Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324(1):1–8. DOI: 10.1056/NEJM199101033240101. PMID: 1701519.
18. Baluk P., Hashizume H., McDonald D.M. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15(1):102–11. DOI: 10.1016/j.gde.2004.12.005. PMID: 15661540.
19. Luukkaa H., Laitakari J., Vahlberg T. et al. Morphometric analysis using automated image analysis of CD34-positive vessels in salivary gland acinic cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2007;127(8):869–73. DOI: 10.1080/00016480601053099. PMID: 17763000.
20. Mucci L.A., Powolny A., Giovannucci E. et al. Prospective study of prostate tumor angiogenesis and cancer-specific mortality in the health professionals follow-up study. *J Clin Oncol* 2009;27(33):5627–33. DOI: 10.1200/JCO.2008.20.8876. PMID: 19858401.
21. Taverna G. Fractal analysis of two-dimensional vascularity in primary prostate cancer and surrounding non-tumoral parenchyma. *Pathol Res Pract*. 2009;205(7):438–44. DOI: 10.1016/j.prp.2008.12.019. PMID: 19232838.
22. Naik R.P., Jin D., Chuang E. et al. Circulating endothelial progenitor cells correlate to stage in patients with invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008;107(1):133–8. DOI: 10.1007/s10549-007-9519-6. PMID: 18043899.
23. Richter-Ehrenstein C., Rentzsch J., Runkel S. et al. Endothelial progenitor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2007;106(3):343–9. DOI: 10.1007/s10549-007-9505-z. PMID: 17972175.
24. Sussman L.K., Upalakin J.N., Roberts M.J. et al. Blood markers for vasculogenesis increase with tumor progression in patients with breast carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2003;2(3):255–6. PMID: 12878859.

ВЛИЯНИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ ГИДРОКСАМОВЫХ КИСЛОТ НА АКТИВНОСТЬ Ca^{2+} -АТФАЗЫ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА И ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКОГО ГУАНОЗИНМОНОФОСФАТА

Л. В. Татьянаенко, И. В. Выстороп, О. В. Доброхотова, И. Ю. Пихтелева, А. И. Котельников

ФГБУ «Институт проблем химической физики» РАН; Россия, 142432, Московская область, Ногинский район, г. Черноголовка, пр-т академика Семенова, 1

Контакты: Лилия Васильевна Татьянаенко kotel@icp.ac.ru

Цель исследования – изучение действия циклических гидроксамовых кислот (ЦГК) I–VI на функцию ферментов Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума (Ca^{2+} -АТФазы СР) и фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ).

Материалы и методы. Измерение активности Ca^{2+} -АТФазы и ФДЭ цГМФ.

Результаты. Показано, что ЦГК I–VI в исследованных концентрациях (0,1; 0,01 и 1 мкМ) разобщают гидролитическую и транспортную функции фермента Ca^{2+} -АТФазы СР, что предполагает антиметастатический эффект этих соединений. Так, в 0,1 мМ концентрации ЦГК тормозят активный транспорт Ca^{2+} через мембрану саркоплазматического ретикулума (СР) на 40 ± 4 % (ЦГК-I), 50 ± 5 % (ЦГК-II), 53 ± 5 % (ЦГК-III), 70 ± 8 % (ЦГК-V), 75 ± 8 % (ЦГК-VI) и ингибируют гидролиз аденозинтрифосфата (АТФ) на 20 ± 2 ; 0; 45 ± 5 ; 47 ± 3 % соответственно. ЦГК-III, ЦГК-V и ЦГК-VI ингибируют активный транспорт Ca^{2+} на 46 ± 5 ; 47 ± 5 и 60 ± 6 % и не ингибируют или ингибируют на 23 ± 2 и 27 ± 3 % гидролиз АТФ при 0,01 мМ концентрации. ЦГК-V обратимо и неконкурентно тормозит гидролитическую функцию Ca^{2+} -АТФазы СР с $K_i = 0,4$ мМ. Все исследованные ЦГК в 0,1 мМ концентрации тормозят активность ФДЭ цГМФ менее чем на 20 %.

Выводы. Полученные данные позволяют прогнозировать антиметастатическую активность соединений ЦГК-II, ЦГК-III, ЦГК-V, ЦГК-VI и рекомендовать их для углубленного изучения на животных в качестве перспективных лекарственных препаратов антиметастатического действия.

Ключевые слова: Ca^{2+} -АТФаза саркоплазматического ретикулума, фосфодиэстераза циклического гуанозинмонофосфата, циклические гидроксамовые кислоты

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-23-27

THE EFFECT OF CYCLIC HYDROXAMIC ACIDS ON ACTIVITY OF Ca^{2+} -ATPASE OF SARCOPLASMIC RETICULUM AND CYCLIC GUANOSINE MONOPHOSPHODIESTERASE

L. V. Tat'yanenko, I. V. Vystorop, O. V. Dobrokhotova, I. Yu. Pikhteleva, A. I. Kotelnikov

Institute of Problems of Chemical Physics RAS; Academician Semenov avenue 1, Chernogolovka, Moscow region, 142432, Russia

Objective. The aim of the study was to research effect of new cyclic hydroxamic acids (CHA) I–VI on activity of Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum and cyclic guanosine monophosphodiesterase.

Materials and methods. Activity of Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum and cyclic guanosine monophosphodiesterase has been evaluated.

Results. It has been shown that at studied concentration (0.1 mM; 0.01 and 1 mM), CHA I–VI separate hydrolytic and transporting functions of Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. Therefore, the antimetastatic effect of these compounds is assumed. Thus, at concentration of 0.1 mM, CHA inhibit active transport of calcium through the sarcoplasmic reticulum membrane by 40 ± 4 % (CHA-I), 50 ± 5 % (CHA-II), 53 ± 5 % (CHA-III), 70 ± 8 % (CHA-V) and 75 ± 8 % (CHA-VI) and inhibit hydrolysis of ATP by 20 ± 2 %, 0 %, 0 %, 45 ± 5 % and 47 ± 3 % respectively. CHA-III, CHA-V and CHA-VI inhibit active transport of Ca^{2+} by 46 ± 5 %, 47 ± 5 % and 60 ± 6 %, and not inhibit or inhibit by 23 ± 2 % and 27 ± 3 % respectively, hydrolysis of ATP at concentration of 0.01 mM. CHA-V inhibits reversibly and non-competitively the hydrolytic function of Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum with $K_i = 4 \times 10^{-5}$ M. All studied CHA inhibit activity of cyclic guanosine monophosphodiesterase at concentration of 0.1 mM, by less than 20 %.

Conclusion. The data obtained predicts the antimetastatic activity of compounds CHA-II, CHA-III, CHA-V, CHA-VI. We recommend to study of CHA-II, CHA-III, CHA-V, CHA-VI on animal models as promising antimetastatic drugs.

Key words: Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum, cyclic guanosine monophosphodiesterase, cyclic hydroxamic acids

Введение

Гидроксамовые кислоты (RCONHOH) обладают широким спектром биологической активности [1]. Они тормозят рост экспериментальных опухолей [2], ингибируют металлоферменты [3], гистондеацетилазу [4], вовлечены в различные процессы опухолевой трансформации клеток. Ранее нами было показано, что антимагастатическое действие ряда химических соединений связано с ингибированием транспортной функции фермента Ca^{2+} -АТФазы СР, т. е. с нарушением баланса внутри- и внеклеточного содержания ионов Ca^{2+} [5–9], что приводит к уменьшению адгезии метастазирующих клеток к эндотелию капилляров [10].

Известно, что торможение фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) приводит к накоплению цГМФ, который является вторичным мессенджером, влияющим на вазодилаторный, антигипертензивный и антиагрегационный эффекты в живых организмах [11].

Целью настоящего исследования является изучение действия циклических гидроксамовых кислот (ЦГК) I–VI на функцию ферментов Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума (Ca^{2+} -АТФазы СР) и ФДЭ цГМФ.

Материалы и методы

В работе использовали альбумин человека, имидазол, цГМФ, нуклеотидазу, аденозинтрифосфат (АТФ) (Sigma, Япония), гистидин, этилендиаминтетрауксусную кислоту, трихлоруксусную кислоту, сахарозу, соли MgCl_2 , NaCl , KCl , CaCl_2 , оксалат натрия, молибдат аммония (MoNH_4) («Реахим», Россия) после соответствующей дополнительной очистки. Фермент Ca^{2+} -АТФазу СР выделяли из белых мышц задних конечностей кроликов по методу [12], поскольку белые волокна отличаются высокой активностью фосфоорилазы, альдолазы, пируваткиназы, лактатдегидрогеназы, глицерофосфатдегидрогеназы и Ca^{2+} -АТФазы СР.

Гидролитическую активность Ca^{2+} -АТФазы измеряли по методу [12]. Реакционная среда содержала 4 мМ MgCl_2 , 2,5 мМ имидазола, 100 мМ NaCl , 5 мМ оксалата натрия, 0,04 мг альбумина и 2 мМ АТФ, рН 7,2. Реакцию инициировали добавлением 0,1 мМ CaCl_2 . Активность Ca^{2+} -АТФазы определяли по изменению рН среды. В результате указанной реакции соотношение протонов и фосфат-ионов составляет 1:1. Гидролитическую активность Ca^{2+} -АТФазы рассчитывали из тангенса угла наклона касательной к начальному участку кривой, описывающей кинетику накопления фосфат-ионов в результате гидролиза АТФ. Об активном транспорте ионов Ca^{2+} судили по времени их полного поглощения везикулами СР, что приводит к прекращению реакции гидролиза АТФ. Изменение гидролитической и транспортной

функций Ca^{2+} -АТФазы под действием ЦГК изучали в зависимости от концентрации соединений.

Относительную активность фермента рассчитывали по формуле:

$$I = 100 (A_0 - A) / A_0,$$

где I – относительная активность; A_0 – удельное содержание фосфат-ионов в контрольной пробе; A – удельное содержание фосфат-ионов в опытной пробе.

Фермент ФДЭ цГМФ выделяли из коры головного мозга крыс линии «Вистар» [13].

Активность ФДЭ цГМФ определяли спектроскопическим методом при $\lambda = 735$ нм с использованием спектрофотометра «Specord M-40» (Carl Zeiss Jena, Германия) по количеству образовавшегося в процессе ферментативной реакции гуанозинмонофосфата (ГМФ), которое равно количеству фосфат-ионов, выделившихся из ГМФ при добавлении нуклеотидазы [13].

Соединения:

ЦГК-I (1-гидрокси-3-изопропил-7,7,9,9-тетраметил-1,4,8-триазаспиро [4.5] декан-2-он),

ЦГК-II (1-гидрокси-3-изобутил-7,7,9,9-тетраметил-1,4,8-триазаспиро [4.5] декан-2-он),

ЦГК-III (1-гидрокси-3-бензил-7,7,9,9-тетраметил-1,4,8-триазаспиро [4.5] декан-2-он),

ЦГК-IV (1-гидрокси-3-изопропил-8-метил-1,4,8-триазаспиро [4.5] декан-2-он),

ЦГК-V (1-гидрокси-3-изобутил-8-метил-1,4,8-триазаспиро [4.5] декан-2-он)

ЦГК-VI (1-гидрокси-3-бензил-8-метил-1,4,8-триазаспиро [4.5] декан-2-он)

получены по методике, аналогичной таковой, упомянутой в работах [14, 15], по синтезу ЦГК на основе глицина ($R = H$) и DL-аланина ($R = \text{CH}_3$). Структуры соединений ЦГК I–VI приведены на рис. 1.

Результаты и обсуждение

Действие соединений ЦГК I–VI на гидролитическую и транспортную функции фермента Ca^{2+} -АТФазы СР исследовалось после 5 мин преинкубации препарата с ферментом. Растворы соединений готовили непосредственно перед добавлением в реакционную среду.

Как видно в табл. 1, соединения ЦГК-I, ЦГК-II, ЦГК-III, ЦГК-IV, ЦГК-V, ЦГК-VI в 0,1 мМ концентрации на 40 ± 4 ; 50 ± 5 ; 53 ± 5 ; 0 ; 70 ± 7 ; 75 ± 7 % тормозят транспортную функцию Ca^{2+} -АТФазы СР и на 20 ± 2 ; 0 ; 11 ± 1 ; 45 ± 5 и 77 ± 5 % ингибируют гидролиз АТФ соответственно. Они преимущественно тормозят активный транспорт ионов Ca^{2+} через мембрану СР, разобщая гидролитическую и транспортную функции фермента.

Теоретическое соотношение $[\text{Ca}^{2+}] / [\text{АТФ}]$ (удельной скорости транспорта Ca^{2+} и удельной скорости

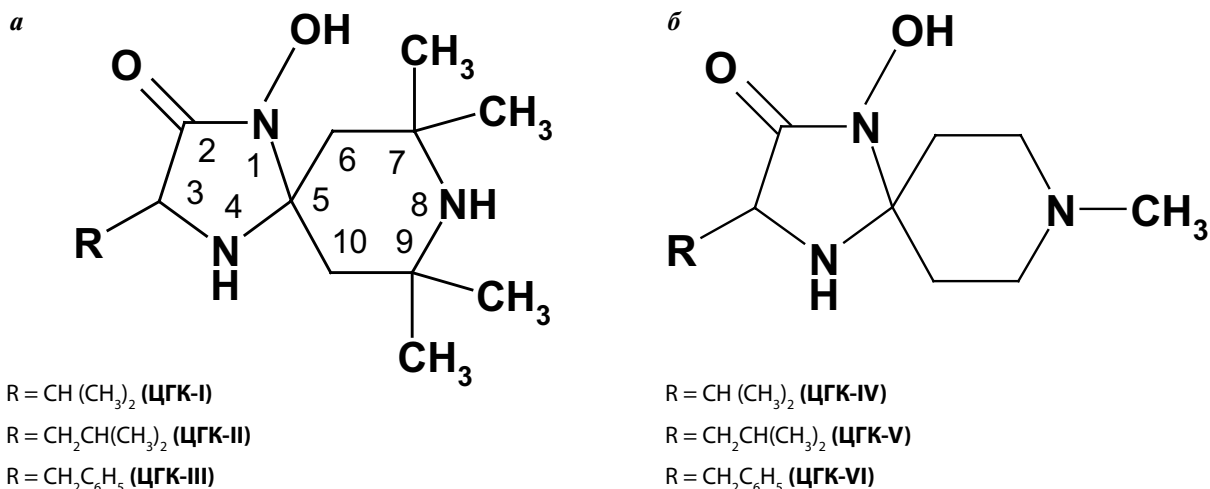


Рис. 1. Молекулярная структура циклических гидроксамовых кислот (ЦГК): а – ЦГК I–III; б – ЦГК IV–VI

гидролиза АТФ) равно 2, что соответствует переносу 2 ионов Ca^{2+} через мембрану СР при гидролизе 1 молекулы АТФ. В наших экспериментах это соотношение в норме равно 1,45. Разобшение гидролитической и транспортной функций Ca^{2+} -АТФазы СР при действии исследуемых ЦГК показывает, что при гидролизе 1 молекулы АТФ в везикулы СР переносится меньшее количество ионов Ca^{2+} , чем в норме (табл. 1, 2). Возникающее при этом изменение соотношения вне- и внутриклеточных ионов Ca^{2+} , безусловно, вызывает нарушение агрегации тромбоцитов, их связи с метастазирующими клетками и в конечном итоге предотвращает агрегацию последних к стенкам сосудов [10]. Так, ранее на примере металлокомплексов Pt (IV), Pd (II) [6] и ЦГК на основе глицина и DL-аланина было показано, что существует четкая корреляция индекса ингибирования метастазов меланомы В16 в опытах *in vivo* с коэффициентом транс-

мембранного переноса ионов Ca^{2+} в везикулы СР [6, 7]. Поэтому можно полагать, что соединения ЦГК-I (на основе DL-валина), ЦГК-II, ЦГК-III, ЦГК-V (на основе DL-лейцина) и ЦГК-VI (на основе DL-фенилаланина) являются потенциальными препаратами антиметастатического действия.

Углубленное изучение одного из наиболее активных препаратов данного класса, ЦГК-V, показало, что ЦГК-V является обратимым ингибитором функции Ca^{2+} -АТФазы СР, так как гидролитическая и транспортная функции фермента после диализа в 100-кратном объеме инкубационной среды в течение 24 ч при 3 °С в значительной степени восстанавливаются (табл. 3).

Константу ингибирования (K_i) под влиянием ЦГК-V (рис. 2) рассчитывали, используя численные значения максимальных скоростей процесса гидролиза АТФ. Как видно из рис. 2, ЦГК-V неконкурентно тормозит гидролитическую функцию Ca^{2+} -АТФазы

Таблица 1. Влияние циклических гидроксамовых кислот на активность Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума

Индекс кислоты	Торможение активности Ca^{2+} -АТФазы СР (% от контроля) в зависимости от концентрации кислоты в пробах, мМ					
	0,1 мМ		0,01 мМ		0,001 мМ	
	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca^{2+}	Гидролиз АТФ
ЦГК-I	40 ± 4*	20 ± 2	20 ± 2*	10 ± 1	0	0
ЦГК-II	50 ± 5*	0	29 ± 3*	0	11 ± 1	0
ЦГК-III	53 ± 5*	0	46 ± 5*	0	34 ± 3*	0
ЦГК-IV	0	11 ± 1	0	0	0	0
ЦГК-V	70 ± 8*	45 ± 5	47 ± 5*	23 ± 2	33 ± 3	20 ± 2
ЦГК-VI	75 ± 7*	47 ± 5	60 ± 6*	27 ± 3	38 ± 4*	25 ± 2

Примечание. Даны среднеквадратичные ошибки результатов (6–9 опытов). * $p < 0,01$ активного транспорта Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума (СР) по сравнению с гидролизом аденозинтрифосфата (АТФ).

Таблица 2. Влияние циклических гидроксамовых кислот на соотношение $[Ca^{2+}]/[ATФ]$

Индекс кислоты	Концентрация кислоты, мМ								
	0,1	0,01	0,001	0,1	0,01	0,001	0,1	0,01	0,001
	Гидролиз АТФ [P _i]/мг белка, мин			Активный транспорт Ca ²⁺ [Ca ²⁺]/мг белка, мин			Отношение [Ca ²⁺]/[АТФ]		
ЦГК-I	0,59	0,64	1,2	0,69	0,74	1,7	1,17	1,2	1,42
ЦГК-II	1,2	1,2	1,2	0,88	1,33	1,7	0,73	1,1	1,42
ЦГК-III	1,2	1,2	1,2	0,83	0,98	1,38	0,69	0,82	1,15
ЦГК-IV	1,2	1,25	1,2	1,8	1,74	1,7	1,5	1,4	1,42
ЦГК-V	1,78	1,5	1,3	0,69	1,0	1,23	0,4	0,66	0,95
ЦГК-VI	2,34	2,1	3,0	0,85	1,11	1,7	0,36	0,53	0,6

Примечание. Отношение $[Ca^{2+}]/[ATФ]$ в контроле составляет 1,45, $n = 6$ (число опытов с каждой кислотой).

Таблица 3. Влияние ЦГК-V на гидролитическую и транспортную функции Ca²⁺-АТФазы саркоплазматического ретикула до и после диализа

Индекс кислоты	Торможение активности Ca ²⁺ -АТФазы СР (% от контроля)			
	До диализа		После диализа	
	Активный транспорт Ca ²⁺	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca ²⁺	Гидролиз АТФ
ЦГК-V	75 ± 8*	45 ± 5*	15 ± 3*	0

Примечание. В диализуемые пробы добавляем 0,1 мМ ЦГК-V. Приведены процентные значения 4 опытов по торможению активности Ca²⁺-АТФазы СР с препаратом ЦГК-V ($M \pm m$) %. * $p < 0,01$ по сравнению с контролем (не содержащим проб кислот).

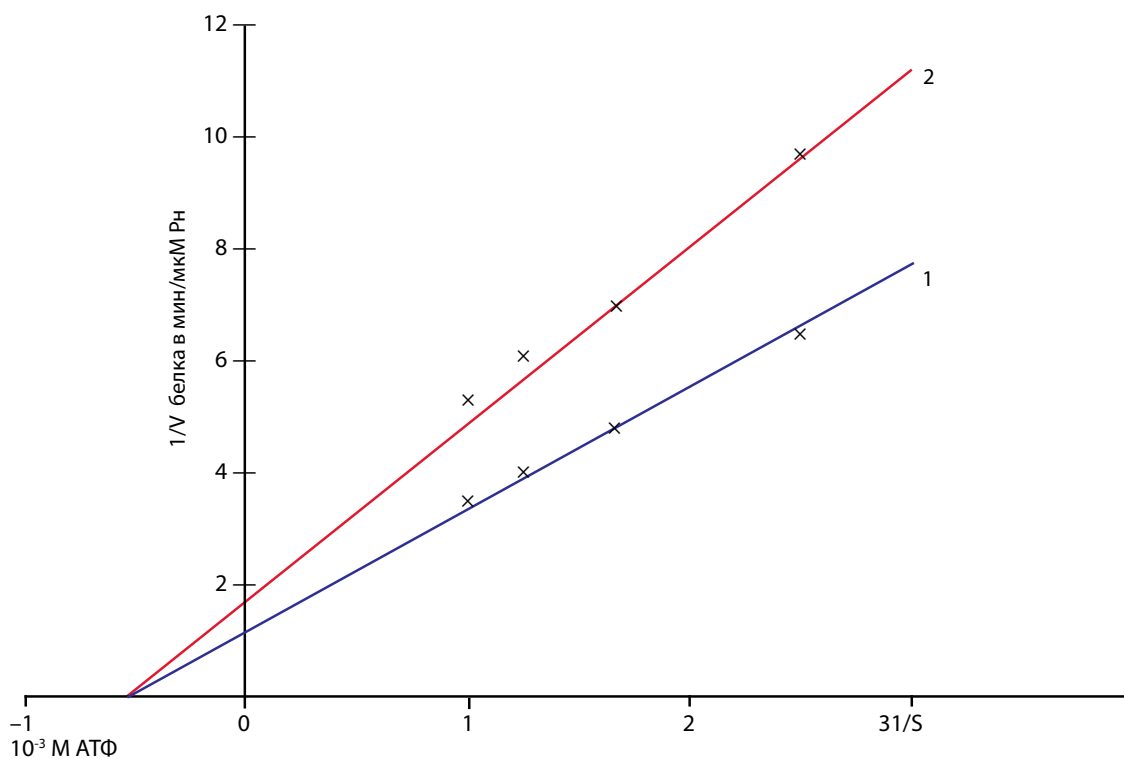


Рис. 2. Зависимость скорости гидролиза АТФ Ca²⁺-АТФазой саркоплазматического ретикула от различных концентраций субстрата (1,0; 0,8; 0,6; 0,4 мМ) в координатах Лайнуивера – Берка: 1 – без ЦГК-V; 2 – с ЦГК-V в концентрации 0,1 мМ

СР с $K_i = 0,04$ мМ. Это свидетельствует о том, что ЦГК-V не связывается с активным центром фермента [16].

Как показали исследования, все изученные нами ЦГК (I–VI) менее чем на 26 ± 2 % тормозят гидролитическую функцию фермента ФДЭ цГМФ (табл. 4). Этот результат предполагает отсутствие их антиагрегационного, вазодилаторного и антигипертензивного действия [11].

Заключение

Полученные данные по влиянию ЦГК I–VI на функцию Ca^{2+} -АТФазы СР позволяют прогнозировать антиметастатическую активность ЦГК-II, ЦГК-III, ЦГК-V, ЦГК-VI и рекомендовать их для углубленного изучения на животных в качестве перспективных лекарственных препаратов антиметастатического действия. Полученные данные также показали, что изученные ЦГК слабо влияют на функцию ФДЭ цГМФ и не могут рассматриваться в качестве препаратов антиагрегационного, антигипертензивного и вазодилаторного действия.

Работа частично финансирована РФФИ (проект № 13-03-01142).

Таблица 4. Влияние циклических гидроксамовых кислот на активность фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата

Индекс кислоты	Торможение активности ФДЭ цГМФ (% от контроля)		
	Концентрация кислоты, М		
	0,1	0,01	0,001
ЦГК-I	$26 \pm 3^*$	$14 \pm 2^*$	0
ЦГК-II	$15 \pm 2^*$	8 ± 1	0
ЦГК-III	8 ± 1	$5 \pm 0,5$	0
ЦГК-IV	$15 \pm 2^*$	$14 \pm 1^*$	0
ЦГК-V	$19 \pm 2^*$	$16 \pm 2^*$	13 ± 1
ЦГК-VI	$16 \pm 2^*$	$14 \pm 1^*$	8 ± 1

Примечание. Приведены процентные значения 6 опытов по торможению активности фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) с каждой кислотой ($M \pm m$) %. * $p < 0,01$ по сравнению с контролем, не содержащим проб кислот. В качестве контроля принимали 100 % активность фермента без добавления изучаемой кислоты.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Marmion C.J., Griffith D., Nolan K.B. Hydroxamic acids – an intriguing family of enzyme inhibitors and biomedical ligands. *Eur J Inorg Chem* 2004;3003–16.
- Eyborlu I.Y., Nahnen Y., Buslei R. et al. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) has potent anti-glioma properties *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*. *J Neurochem* 2005;93(4):992–9. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2005.03098.x. PMID: 15857402.
- Whittaker M., Floyd C.D., Brown P., Gearing A.J. Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Chem Rev* 1999;99:2735–76.
- Miller T.A., Witter D.J., Belvedere S.J. Histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem* 2003;46(24):5097–5116. DOI: 10.1021/jm0303094. PMID: 14613312.
- Коновалова Н.П., Татьяненко Л.В., Волкова Л.М. и др. Ингибирующий эффект радиосенсибилизатора АК-2123 на экспериментальные метастазы в печени и активный транспорт ионов кальция. *Вопросы онкологии* 1997;43(3):305–12.
- Татьяненко Л.В., Коновалова Н.П., Богданов Г.Н. и др. Торможение активного транспорта ионов кальция металлокомплексами Pt(IV) Pd(II). Корреляция этого процесса с антиметастатическим действием препаратов. *Журнал биомедицинской химии* 2006;52(2):155–169.
- Татьяненко Л.В., Доброхотова О.В., Коновалова Н.П. и др. Влияние циклических гидроксамовых кислот на основе глицина и DL-аланина на активность гидролаз Ca^{2+} - Mg^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума и фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата. *Химико-фармацевтический журнал* 2013;47(5):135–7.
- Konvalova N.P., Völkova L.M., Tatyatenko L.V. et al. Inhibitory effect of radiosensitizer AK-2123 on experimental hepatic metastases and Ca^{2+} -active transport. *Neoplasma* 1997;44(6):361–5. PMID: 9605008.
- Konvalova N.P., Völkova L.M., Tatyatenko L.V. et al. Comparative inhibitory effect of radiosensitive AK-2123 and 5-Fu on experimental hepatic metastases sensitization. *News letter* 1997;4(2):3–6.
- Fidler I.J. Critical factor in the biology of human cancer metastasis: twenty-eight G.H. Aclowes memorial awara lecture. *Cancer Res* 1990;50(19):6130–8. PMID: 1698118.
- Граник В.Г., Григорьев Н.Б. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств. М., 2004. С. 360–365.
- Ритов В.Б., Мельгунов В.М., Комаров П.Г. Интегральные белки мембран саркоплазматического ретикулума скелетных мышц кролика и карпа. Доклады АН СССР 1977;233(4):730–3.
- Татьяненко Л.В., Доброхотова О.В., Богданов Г.Н. и др. Действие амитриптилина, имипромина и хлорпромазина на активность фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата. *Химико-фармацевтический журнал* 2008;52(2):174–9.
- Выстороп И.В., Коновалова Н.П., Нелюбина Ю.В. и др. Циклические гидроксамовые кислоты на основе альфа-аминокислот. Сообщение 1. Региоселективный синтез, структура, NO-донорная и антиметастатическая активность спирибициклических гидроксамовых кислот на основе глицина и DL-аланина. *Известия АН, серия химическая* 2010;1:127–34.
- Выстороп И.В., Коновалова Н.П., Нелюбина Ю.В. и др. Циклические гидроксамовые кислоты на основе альфа-аминокислот. Сообщение 2. Региоселективный синтез, кристаллическая структура и противоопухолевая активность спирипиридин-имидазолидин-гидроксамовых кислот на основе глицина и DL-аланина. *Известия АН, серия химическая* 2013;5:1272–81.
- Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М., 1973. С. 77–84.

ДЕЙСТВИЕ ИНТЕРФЕРОНОВ И ИНДУКТОРОВ ИНТЕРФЕРОНОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ РЕЦЕПТОРОВ TLR/RLR И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ОПУХОЛЕВЫХ ЛИНИЙ КЛЕТОК ТНР-1 И НСТ-116

Т.М. Соколова¹, В.В. Полосков¹, О.С. Бурова², А.Н. Шувалов¹, З.А. Соколова², А.Н. Иншаков²,
Ю.В. Шишкин¹, Ф.И. Ершов¹

¹ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России;
Россия, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18;

²ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478,
Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Татьяна Михайловна Соколова tmsokolovavir@mail.ru

Цель исследования — изучение действия известных препаратов интерферонов (ИФН) 1-го типа и ИФН-индукторов с разной химической структурой на дифференцировку и экспрессию генов паттернраспознающих рецепторов TLR/RLR.

Материалы и методы. Линии опухолевых клеток ТНР-1 (острый моноцитарный лейкоз) и НСТ-116 (аденокарцинома толстой кишки) обрабатывали рекомбинантными ИФН 1-го типа (альтевир, реаферон, генфаксон, инфибета 10^5 – 10^6 МЕ), ИФН-индукторами (ридостин 10^2 – 10^3 мкг/мл, циклоферон 625 мкг/мл) и иммуномодулятором (иммуномакс 2 МЕ); препараты добавляли к клеткам на 24 и 96 ч при 37 °С. Экспрессию генов определяли методом количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией на приборе CFX-96, CD-фенотипы клеток ТНР-1 — методом проточной цитометрии с мечеными FITC или PE моноклональными антителами. Измерение делали на проточном цитофлуориметре FACSCanto II.

Результаты. Показано, что линии опухолевых клеток ТНР-1 и НСТ-116 имеют на протяжении 5 пассажей низкие и нестабильные уровни экспрессии генов паттернраспознающих рецепторов TLR/RLR. Такой генный статус, возможно, связан с нарушением процессинга зрелых форм мРНК. В клетках ТНР-1 преимущественно активируются гены TLR4, TLR8 и фактор NFκB, а в клетках НСТ-116 — гены TLR7, TLR8, TLR9 и фактор NFκB. Наиболее сильным стимулятором TLR/RLR-рецепторов является ридостин.

Ридостин повышает уровень экспрессии маркера макрофагов CD11b, циклоферон и иммуномакс — раннего Т-клеточного антигена CD7, реаферон — HLA-DR. Препараты циклоферон, иммуномакс, реаферон снижают уровень экспрессии миелоидного маркера CD38.

Выводы. Исследованные препараты ИФН и ИФН-индукторов по-разному регулируют экспрессию генов группы паттернраспознающих рецепторов TLR/RLR в опухолевых линиях клеток ТНР-1 и НСТ-116. В клетках острого моноцитарного лейкоза активация генной активности TLR/RLR сопровождается изменением CD-фенотипов дифференцировки.

Ключевые слова: экспрессия генов TLR/RLR, CD-фенотип, препараты ИФН и ИФН-индукторов, клетки ТНР-1, НСТ-116

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-28-33

ACTION INTERFERONS AND IFN-INDUCTORS ON TLR/RLRS GENES EXPRESSION AND DIFFERENTIATION OF TUMOR CELL LINES THP-1 AND HCT-116

T.M. Sokolova¹, V.V. Poloskov¹, O.S. Burova², A.N. Shuvalov¹, Z.A. Sokolova², A.N. Inshakov², Yu. V. Shishkin¹, F.I. Ershov¹

¹N. F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology; 18 Gamaleya str., Moscow, 123098, Russia;

²N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoye shosse, Moscow, 115478, Russia

Objective. To study of known interferons (IFN) type I and IFN-inductors drugs different chemical structure on cell differentiation and expression group of genes of TLR/RLRs, referring to group of pattern-recognition receptors.

Materials and methods. Cellular lines THP-1 (acute monocytic leukemia) u HCT-116 (colon adenocarcinoma) were treated by interferons drugs Reaferon, Altevir, Genfakson, Infibeta 10^5 – 10^6 ME, IFN-inductors Ridostin 10^2 – 10^3 μg/ml, Cycloferon 625 μg/ml and Immunomax 2 ME during 24 h or 96 h at 37 °C. Gene expression were estimated by method qRT-PCR (CFX-96, Bio-Rad). CD-immunophenotypes of THP-1 cells were detected by flow cytometric fluorescence method with FITC and PE monoclonal antibodies (FACSCanto II, Becton Dickinson).

Results. It was shown that tumor cells THP-1 and HCT-116 have low and variable constitutive levels gene expression of TLR-receptors 2, 3, 4, 7, 8, 9 during passages. This gene status may be connected with incorrect processing of mature mRNA forms. Genes TLR4, TLR8 and factor NFκB are stimulated by interferons and IFN-inductors more high in THP-cells and genes TLR7, TLR8, TLR9 and NFκB — in HCT-cells. Ridostin (mix ssRNA and dsRNA *S. cerevisiae*) is the best activator of TLR/RLRs receptors. Ridostin increases

macrophage marker CD11b, Cycloferon, Imunomax stimulate levels of early T-cell antigen CD7, interferons results in growth of HLA DR. The drugs Cycloferon, Imunomax and Reaferon decrease levels of myeloid suppressor CD38.

Conclusion. *Group of recombinant IFNs and IFN-inductor drugs various chemical structures regulate TLR/RLRs genes expression differently in THP-1 and HCT-116. TLR/RLRs genes activation are accompanied by CD-phenotypes changes in THP-1 monocytic cell line.*

Key words: *TLR/RLRs gene expression, CD-phenotype, interferons, IFN-inductors drugs, human tumor cell lines THP-1 and HCT-116*

Введение

У человека известны 10 видов толлподобных рецепторов, которые инициируют клеточные иммунные ответы к разным молекулярным структурам: микробным липопептидам (TLR1, TLR2, TLR6), липополисахаридам (TLR4), флагеллину (TLR5) и нуклеиновым кислотам (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) [1]. Последние имеют эндосомальную локализацию. Дополнительно существуют 2 цитоплазматических сенсора RIG1 и MDA5 для вирусных и клеточных осРНК и дсРНК. Перечисленные рецепторы являются паттернраспознающими. Они широко представлены в иммунокомпетентных клетках и ткани эпителия. В реализации рецепторных TLR- и RLR-сигналов ключевую роль играет универсальный фактор транскрипции NFκB – активатор промоторов генов воспалительных цитокинов [2].

В отношении регуляции транскрипции генов TLR/RLR-рецепторов опухолевых клеток известно крайне мало. В промоторах TLR-генов имеется нуклеотидный полиморфизм, ассоциированный с риском развития ряда форм рака [3]. При этом способность TLR-рецепторов опухолевых клеток к специфическому взаимодействию с химическими структурами лигандов сохраняется.

Роль TLR/RLR-рецепторов в процессах канцерогенеза рассматривается неоднозначно. Их активация может оказывать на развитие опухоли как положительное, так и отрицательное влияние [4]. Клетки лейкозов, меланомы, рака предстательной железы и рака молочной железы имеют повышенное количество рецепторов, которые рассматриваются как маркеры воспаления [5, 6]. В какой мере это свойственно трансформированным клеточным линиям и может регулироваться препаратами интерферонов (ИФН) и лигандами TLR/RLR-рецепторов, остается неизвестным.

ИФН стимулируют транскрипцию сотен клеточных генов, участвующих в антивирусном и пролиферативном ответах. В числе ИФН-регулируемых находится группа TLR-генов [7]. Стимуляция наблюдается в нормальных типах клеток, чувствительных к ИФН. Рекомбинантные ИФН α-2 – наиболее применяемые в противоопухолевой терапии [8]. Исследованные нами препараты ридостин, циклоферон и иммуномакс сочетают в себе свойства ИФН-индукторов и TLR-лигандов [9]. Они имеют широкое применение

в медицине как противовирусные и иммуномодулирующие средства [10]. Ридостин (смесь дсРНК и осРНК киллерных штаммов грибов *Sacharomyces cerevisiae*) является агонистом рецепторов TLR3, TLR8 и MDA5. Циклоферон (N-метилглюкаминная соль акридонуксусной кислоты) взаимодействует с клеточными ДНК и РНК, модифицирует их структуры и делает их «узнаваемыми» TLR3- и TLR9-рецепторами. Иммуномакс (растительный пептидогликан) проявляет лигандсвязывающие свойства в отношении TLR4-рецептора; возможно, является активатором и других сигнальных путей [11].

Взаимодействие TLR/RLR-рецепторов со специфическими агонистами активирует процессы апоптоза, иммунного распознавания и клеточной дифференцировки опухолевых клеток [12].

Нами исследована экспрессия генов 6 видов TLR и 2 видов RLR в разных линиях опухолевых клеток: THP-1 и HCT-116. Клетки THP-1 (острый моноцитарный лейкоз) – известная модель *in vitro* для изучения процессов превращения моноцитов в макрофаги и испытания активности иммунопрепаратов [13]. Представляют интерес анализ CD-фенотипа в этих клетках под действием препаратов и сопоставление его с реакцией генов паттернраспознающих рецепторов TLR/RLR. Клетки HCT-116 (аденокарцинома толстой кишки) были изучены нами ранее в отношении экспрессии генов системы ИФН и апоптоза; согласно полученным данным они имеют существенные нарушения в регуляции рецепторных механизмов и экспрессии генов системы ИФН [14].

Материалы и методы

Препараты ИФН:

альтевир – субстанция ИФН α-2b, 100 млн МЕ/мл («Фармапарк», Россия);

реаферон – ИФН α-2b, ампула 1 млн МЕ («Вектор», Россия);

генфаксон – ИФН β-1a, шприц 0,5 мл, содержащий 22 мкг 6 млн МЕ (Laboratorio TUTEUR S.A.C.I.F.I.A., Аргентина);

инфибета – ИФН β-1b, флакон 8 млн МЕ/мл (ЗАО «Генериум», Россия);

ридостин – рибонуклеат натрия, смесь осРНК и дсРНК (~10 %) киллерных штаммов грибов *Sacharomyces cerevisiae*, ампула 5 мг («Диафарм», Россия);

циклоферон – N-метилглукामीновая соль акридонуксусной кислоты, 12,5 % раствор, ампула 2 мл («Полисан», Россия);

иммуномакс – растительный пептидогликан, иммуномодулятор, флакон 200 ЕД («Иммафарма», Россия).

Клетки

НСТ-116 (аденокарцинома толстой кишки из АТСС-коллекции) и ТНР-1 (острый моноцитарный лейкоз из АТСС-коллекции) были предоставлены лабораторией экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДитО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с 10 % эмбриональной сывороткой телят и антибиотиками. Постановку опытов с препаратами осуществляли в культуральных флаконах 25 см². Плотность клеток суспензионной культуры ТНР-1 составляла 1 млн/мл. Клетки инкубировали с препаратами ИФН 24 ч при 37 °С в опытах по определению экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ–ПЦР) и 96 ч при 37 °С в опытах по определению CD-фенотипа методом проточной цитометрии.

Анализ экспрессии генов методом ОТ–ПЦР в реальном времени

Клетки в количестве 1 млн, промытые 0,1 М фосфатного буфера рН 7,2, лизировали реагентом Trizol (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя и замораживали при –20 °С. Выделенную суммарную ДНК/РНК осаждали изопропанолом и обрабатывали ДНКазой из набора «DNA-free» (Ambion, США). В реакции ОТ с праймерами oligo (dT) 15 или «случайными» (*random*) получали кДНК. Использовали реактивы (фермент MMuLV, RNAsin, 4 вида dNTP) (Promega (США)). В количественной ПЦР анализировали кДНК в разведении 1:5. Добавляли пары специфических праймеров и 2-кратную смесь SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, США). Структуры праймеров на исследованные гены рецепторов TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9 описаны нами ранее [9, 11, 14]. Дополнительно в программе Primer 3 Blast были рассчитаны пары праймеров к мРНК TLR2: прямой 5'– tgcctggccctctctacaаа и обратный 5'– gtgtcttgggaatgcagcct. ПЦР ставили на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США) в режиме реального времени. Протокол ПЦР: 96 °С 2 мин, далее 55 циклов – 94 °С 10 с, 50–54 °С 20 с, 72 °С 30 с. Пороговые циклы (Cq) логарифмической фазы синтеза регистрировали по нарастанию флуоресцентного сигнала красителя EvaGreen, интеркалирующего в ДНК. Анализ экспрессии генов выполняли с помощью программы Data analysis CFX-96. В конечной точке ПЦР по тем-

пературным пикам плавления устанавливали специфичность ДНК-амплификатов, которые анализировали электрофорезом в 1,5 % агарозном геле с бромистым этидием. В отдельных случаях ДНК-амплификаты подвергали секвенированию. В программе Bioedit устанавливали гомологию их первичных структур с имеющимися в GenBank NCBI данными транскриптов мРНК.

Иммуноцитофлуориметрическое определение CD-антигенов

Ставили реакцию иммунофлуоресценции с меченными FITC или PE моноклональными антителами и проводили измерение на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson, США).

Результаты и обсуждение

Экспрессия TLR-генов

TLR/RLR-рецепторы – важные пусковые регуляторы клеточного иммунного ответа. Показано, что активность TLR-рецепторов влияет на рост опухоли и их метастазирование [4]. Сегодня роль иммунных рецепторов рассматривается в более широком плане и включает процессы клеточной дифференцировки [12, 15]. Молекулярные механизмы гематологических заболеваний связаны с функциональным состоянием сигнальных путей иммунного ответа. Комбинация TLR-лигандов с препаратами ИФН оказывает синергичные эффекты на сигнальные клеточные реакции [12].

В табл. 1 представлены конститутивные уровни транскрипции генов рецепторов TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9, фактора NFκB и 18S рибосо-

Таблица 1. Сравнение конститутивной транскрипционной активности генов TLR-рецепторов и фактора NFκB в культурах опухолевых клеток и цельной крови здоровых доноров

Гены/ мРНК	Специфический ПЦР-продукт	Клетки		
		крови* Cq	ТНР-1 Cq*	НСТ-116 Cq*
TLR2	224 пн, 79 °С	30	37*	42*
TLR3	149 пн, 79 °С	34	> 45	> 45*
TLR4	177 пн, 86 °С	25	37*	> 45*
TLR7	150 пн, 80 °С	33	> 45	> 45
TLR8	133 пн, 80 °С	25	37	38
TLR9	231 пн, 88 °С	35	> 45	> 45
NFκB	113 пн, 78 °С	27	37*	40*
рибРНК	151 пн, 82 °С	20	27	28

Примечание. Cq – пороговые циклы амплификации.

*Культура клеток цельной крови здоровых доноров.

*Дополнительные ПЦР-продукты.

мальной РНК в культурах клеток ТНР-1 и НСТ-116. Для сравнения приведены данные определения уровня экспрессии 18S рибосомальной РНК и мРНК TLR-генов в культуре клеток цельной крови здоровых доноров – модели, наиболее приближенной к норме иммунного ответа *in vitro* [11]. Видно, что в 2 типах опухолевых клеток уровни экспрессии исследованных генов значительно ниже, чем в клетках крови. При этом разница С_q между 18S рибосомальной РНК и мРНК TLR-рецепторов и фактора транскрипции NFκB больше в опухолевых клетках. Практически не выявляемыми на протяжении 45 циклов и более амплификации в обоих типах клеток оказались транскрипты генов рецепторов TLR3, TLR7, TLR9 и, дополнительно, TLR4 в клетках НСТ-116. Все эти рецепторы важны для противовирусного иммунитета и инициируют сигнальные пути, ведущие к синтезу ИФН [1, 9, 12]. Экспрессия генов ре-

цепторов TLR2 и TLR4, а также фактора NFκB была выше в клетках острого моноцитарного лейкоза ТНР-1. Ген рецептора TLR8 был активным в обоих типах опухолевых клеток (см. табл. 1). Между клеточными линиями выявлены определенные различия в конститутивной регуляции транскрипции рецепторных генов, которые, возможно, отражают индивидуальные особенности источников получения клеток.

Данные электрофореза ПЦР-продуктов в агарозных гелях, представленные на рис. 1 и 2, демонстрируют наряду со специфическими ДНК-амплификатами появление в опухолевых линиях ДНК-амплификатов меньшего размера. Следует отметить нестабильную транскрипционную активность исследованных генов в пассажах опухолевых клеток. Стимулирующий эффект препаратов ИФН и ИФН-индукторов в опухолевых клетках был выше при низком или не выявляемом уровне экспрессии TLR-генов. Препараты ИФН и индукторы ИФН были эффективными в высоких дозах (генфаксон и инфибета 10⁵–10⁶ МЕ, ридостин 10²–10³ мкг/мл, циклоферон 625 мкг/мл, иммуномакс 2 МЕ). Они индуцировали в клетках ТНР-1 и НСТ-116 синтез специфических ПЦР-продуктов. При этом в клетках ТНР-1 ридостин, циклоферон, инфибета и иммуномакс сильнее активировали гены TLR4, TLR8 и NFκB. В клетках НСТ-116 реакция генов рецепторов TLR7, TLR8, TLR9 и NFκB на препараты также была положительной, но менее выраженной (см. рис. 2). Низкая и нестабильная активность рецепторных генов в пассажах этих опухолевых линий клеток, по-видимому, согласуется с другими известными нарушениями в рецепторных свойствах [15]. Обнаружение в составе ПЦР-продуктов опухолевых клеток наряду со специфическими дополнительными ДНК-амплификатами меньшего размера дает основание предполагать нарушения в образовании

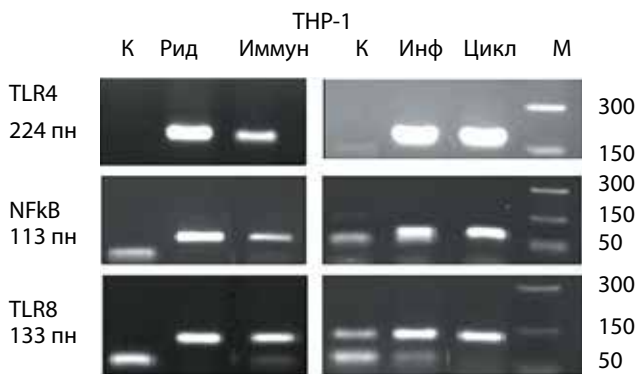


Рис. 1. Электрофорез ПЦР-продуктов генов TLR4, NFκB, TLR8 клеток ТНР-1, стимулированных препаратами ридостин (Рид), иммуномакс (Иммун), инфибета (Инф), циклоферон (Цикл). Дозы препаратов: ридостин – 1000 мкг/мл, иммуномакс – 2 МЕ/мл, инфибета – 1 МЕ/мл, циклоферон – 625 мкг/мл. М – ДНК-маркеры с известными размерами пар нуклеотидов. Слева – название генов и размеры специфических ПЦР-продуктов

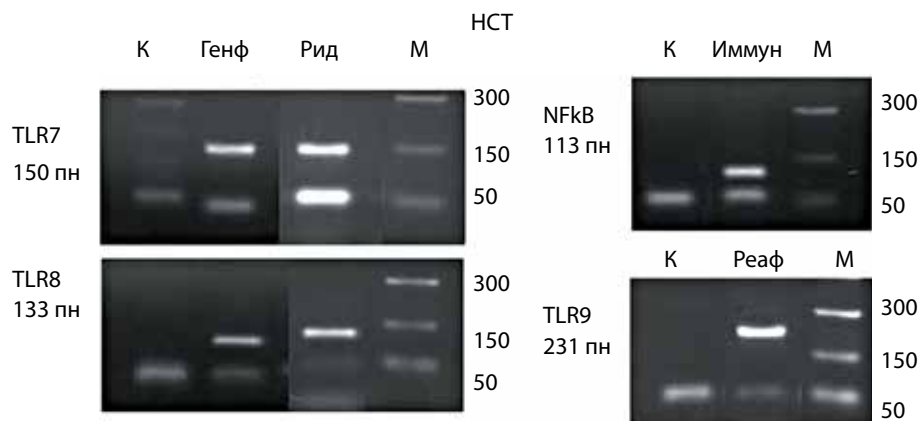


Рис. 2. Электрофорез ПЦР-продуктов генов TLR7, TLR8, NFκB, TLR9 клеток НСТ-116, стимулированных препаратами генфаксон (Генф), ридостин (Рид), иммуномакс (Иммун), реаферон (Реаф). Дозы препаратов: генфаксон – 1 МЕ/мл, ридостин – 1000 мкг/мл, иммуномакс – 2 МЕ/мл, реаферон – 1 МЕ/мл. М – ДНК-маркеры с известными размерами пар нуклеотидов. Слева название генов и размеры специфических ПЦР-продуктов.

зрелых форм мРНК. Такие аномальные ПЦР-продукты отсутствовали в пробах мРНК TLR/RLR генов клеток крови здоровых доноров при использовании тех же пар праймеров [9, 11].

Действие ридостина изучено более подробно. Препарат по химической структуре представляет собой смесь осРНК и дсРНК грибка *Sacharomyces cerevisia* и является ИФН-индуктором и стимулятором транскрипции фактора NFκB. Ридостин – активатор транскрипции генов иммунных рецепторов TLR3, TLR8 в эндосомах и в цитоплазме (MDA5) [9]. В опухолевых клетках ТНР-1 и НСТ-116 препарат показал себя эффективным стимулятором этих рецепторных генов (табл. 2). В клетках моноцитарного лейкоза ТНР-1 препарат индуцировал широкий спектр генов рецепторов TLR2, TLR4, TLR8, RIG1, MDA5 и фактор транскрипции NFκB, не активированным оставался только ген рецептора TLR3. В клетках аденокарциномы толстой кишки НСТ-116 ридостин также оказывал стимулирующее действие на широкий спектр генов, но эффект был несколько слабее. В составе активированных генов в этом случае был ген рецептора TLR3, но отсутствовал ген рецептора TLR9. Таким образом, в 2 линиях клеток разных типов опухолей имелись определенные различия – как в конститутивных, так и в индуцированных спектрах TLR-генов. Тем не менее исследованные препараты ИФН и ИФН-индукторов в опухолевых клетках являлись активаторами иммунных рецепторов на транскрипционном уровне.

Таблица 2. Стимулирующее действие ридостина на экспрессию генов паттернраспознающих рецепторов TLR/RLR в клетках ТНР-1 и НСТ-116

Гены/мРНК	ТНР-1 Сq*		НСТ-116 Сq*	
	Контроль	Ридостин	Контроль	Ридостин
TLR2	39	34↑	43	42
TLR3	> 45	> 45	> 45	42↑
TLR4	40	33↑	> 45	39↑
TLR7	> 45	43	> 45	38↑
TLR8	40	34↑	45	36↑
TLR9	42	40	> 45	> 45
RIG1	> 45	38↑	42	37↑
MDA5	45	34↑	40	38↑
NFκB	43	35↑	43	41

Примечание. *Сq – пороговый цикл амплификации. Представлены результаты 5-го пассажа клеток. Дополнительно исследованы клетки 3-го и 10-го пассажей. Различия в Сq исследованных генов имели подобную закономерность. Стандартная ошибка повторных измерений ПЦР SD ± 1с.

Таким образом, впервые показано стимулирующее действие группы препаратов ИФН (реаферон, инфибета, генфаксон), ИФН-индукторов (ридостин и циклоферон) и иммуномодулятора иммуномакс в опухолевых линиях клеток ТНР-1 и НСТ-116 на гены паттернраспознающих рецепторов. Позитивная регуляция транскрипции TLR/RLR-генов демонстрирует возможность коррекции ими нарушений сигнальных механизмов иммунного ответа в опухолевых клетках ТНР-1 и НСТ-116.

Характеристика CD-фенотипа клеток ТНР-1

Анализ CD-антигенов на поверхности клеток ТНР-1 характеризует их как полиморфную популяцию (табл. 3). В ее составе доминируют (70–90 %) CD3⁺-, CD5⁺-, CD13⁺-, CD14⁺-, CD23⁺-, CD45⁺-лимфоциты и моноциты. Популяция имеет низкое содержание клеток с фенотипом CD11b дифференцированных макрофагов и комплекса HLA-DR. В то же время в популяции выявляются клетки CD38⁺, свойственные моноцитарному лейкозу.

Под действием реаферона, циклоферона и иммуномакса уровень экспрессии миелоидного антигена

Таблица 3. Влияние исследуемых препаратов на CD-кластеры дифференцировки клеток ТНР-1

Иммуно-фенотип	Контроль	Реаферон	Ридостин	Циклоферон	Иммуномакс
CD3 ⁺	85	85	92	91	94
CD5 ⁺	98	94	98	96	87
CD7 ⁺	66	62	<u>77</u>	<u>76</u>	<u>80</u>
CD13 ⁺	86	82	92	89	93
CD14 ⁺	73	71	85	84	85
CD23 ⁺	99	92	96	95	98
CD38 ⁺	74	<u>36</u>	67	<u>28</u>	<u>32</u>
CD45 ⁺	87	81	88	86	93
CD4 ⁺	45	<u>39</u>	<u>58</u>	<u>24</u>	<u>31</u>
CD95 ⁺	30	27	37	<u>14</u>	<u>11</u>
CD8	0	0	0	0,1	0,1
CD11b	2,2	1,1	<u>5,5</u>	1,0	1,3
CD25	8,0	<u>1,5</u>	6,4	<u>2,0</u>	<u>1,1</u>
HLA-DR	2,2	<u>16,3</u>	3,8	2,2	3,5

Примечание. Показатели иммунофенотипов клеток ТНР-1 выражены в % содержания. Подчеркиванием выделены изменения CD. Представлены результаты типичного эксперимента. Средняя стандартная ошибка измерения в 3 независимых исследованиях не превышала 10 %. Достоверность оценивали по критерию Стьюдента при p < 0,05.

CD38 снижается. Антиген CD38 рассматривают как прогностический показатель при Т- и В-лейкозах и мишень для терапии моноклональными антителами [15]. Пока остается неясным, в какой мере снижение его экспрессии связано с активацией генов иммунных TLR/RLR-рецепторов. Для ответа на этот вопрос требуются дополнительные исследования с разными TLR-агонистами и мутантными клетками [12].

Реаферон повышает уровень экспрессии главного комплекса гистосовместимости II класса HLA-DR, эффект ридостина проявляется небольшим ростом числа клеток CD11b⁺ и CD4⁺. Иммуномакс, циклоферон и ридостин повышают в составе клеточной популяции уровень CD7⁺ клеток. Все препараты, кроме ридостина, незначительно снижают содержание CD25⁺-лимфоцитов, а циклоферон и иммуномакс понижают уровень экспрессии антигена CD95.

Заключение

Эффекты препаратов ИФН и ИФН-индукторов на CD-антигены показывают их способность изменять процессы клеточной дифференцировки. В дальнейшем необходим поиск более эффективных комбинаций препаратов рекомбинантных ИФН 1-го типа с TLR/RLR-лигандами, которые сегодня уже применяются как специфические агонисты [1, 12]. Более детальный анализ их действия на CD-фенотипы линий опухолевых клеток позволит подбирать препараты с аддитивными эффектами. Дифференцировка клеток ТНФ-1 и НСТ-16 регулируется как на транскрипционном уровне с участием фактора NFκB, так и на посттранскрипционном (созревание мРНК). В дальнейшем необходимо изучить препарат ридостин, сочетающий свойства ИФН-индуктора и лиганда нескольких рецепторов (TLR3, TLR8, MDA5) на клетках, полученных из образцов опухолей и их микроокружения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Paul-Clark M.J., George P.M., Catheral T. et al. Pharmacology and therapeutic potential of pattern recognition receptors. *Pharmacol Ther* 2012;135(2): 200–15. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.05.007. PMID: 22627269.
- Kawai T., Akira S. Signaling to NF-κappaB by toll-like receptors. *Trends Mol Med* 2007;13(11):460–9. DOI: 10.1016/j.molmed.2007.09.002. PMID: 18029230.
- Kutikhin A.G. Association of polymorphisms in TLR genes and in genes of the toll-like receptors signaling pathway with cancer risk. *Hum Immunol* 2011;72:1095–116. DOI: 10.1016/j.humimm.2011.07.307. PMID: 21872627.
- Pandey S., Singh S., Anang V. et al. Pattern recognition receptors in cancer progression and metastasis. *Sanjay Cancer Growth Metastasis* 2015;8:25–34. DOI: 10.4137/CGM.S24314. PMID: 26279628.
- Li T.T., Ogino S., Qian Z.R., World J. Toll-like receptor signaling in colorectal cancer: carcinogenesis to cancer therapy. *Gastroenterol* 2014;20(47):17699–708. DOI: 10.3748/wjg.v20.i47.17699. PMID: 25548469.
- Cannova J., Breslin S.J. P., Zhang J. Toll-like receptor signaling in hematopoietic homeostasis and the pathogenesis of hematologic diseases. *Front Med* 2015;9(3):288–303. DOI: 10.1007/s11684-015-0412-0. PMID: 26297301.
- Khoo J.J., Forster S., Mansell A. Toll-like receptors as interferon-regulated genes and their role in disease. *J Interferon and Cytokine Res* 2011;31(1):13–25. DOI: 10.1089/jir.2010.0095. PMID: 21198355.
- Zitvogel L., Galluzzi L., Kepp O. et al. Type I interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol* 2015;15(7):405–14. DOI: 10.1038/nri3845. PMID: 26027717.
- Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Полосков В.В., Ершов Ф.И. Стимуляция генов сигнальной трансдукции препаратами Ридостин, Циклоферон и Ингавирин. Цитокины и воспаления 2015;2:26–34.
- Ершов Ф.И. Антивирусные препараты. Справочник. 2-е изд. М., 2006.
- Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Шаповал И.М. и др. Активация генов сигнальных путей иммунитета: различная индивидуальная чувствительность клеток крови человека к препаратам интерферонов и индукторов ИФН. *Медицинская иммунология* 2015;1:7–18. DOI: 10.15789/1563-0625-2015-1-7-18.
- Kaczanowska S., Joseph A.M., Davila E. TLR agonists: our best frenemy in cancer immunotherapy. *Cellular & Molecular Immunology* 2011;8:341–47. DOI: 10.1189/jlb.1012501. PMID: 23475577.
- Chanput W., Mes J.J., Wichers H.J. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol* 2014;23(1):37–45. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.08.002. PMID: 25130606.
- Соколова Т.М., Кособокова Е.Н., Шувалов А.Н. и др. Активность генов системы интерферона в клетках аденокарциномы толстого кишечника НСТ-116: регуляция рекомбинантными интерферонами альфа-2 из бактериальных и растительных продуцентов. *Российский биотерапевтический журнал* 2013;3:39–44.
- Nguyen-Pham T-N., Lim M-S., Nguyen T.A. et al. Type I and II interferons enhance dendritic cell maturation and migration capacity by regulating CD38 and CD74 that have synergistic effects with TLR agonists. *Cell Mol Immunol* 2011;8(4): 341–7. DOI: 10.1038/cmi.2011.7. PMID: 21423200.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *CD95/FAS* В КЛЕТКАХ ЛИНИЙ МЕЛАНОМЫ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ АРАНОЗЫ

Д.А. Афанасьева, В.А. Мисюрин, А.В. Пономарев, И.М. Лученко, О.С. Бурова, М.А. Барышникова

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Мария Анатольевна Барышникова ma_ba@mail.ru

Введение. Араноза является алкилирующим агентом, благодаря чему демонстрирует цитотоксические и цитостатические эффекты. Ряд исследований показал, что липосомальная лекарственная форма аранозы обладает некоторыми преимуществами перед традиционной растворимой формой. Интересно, что липосомальная форма некоторых алкилирующих агентов, например цисплатина, повышает уровень экспрессии мРНК генов внешнего пути апоптоза.

Цель исследования — изучение влияния липосомальной и свободной форм аранозы на активность генов, кодирующих рецепторы внешнего пути апоптоза *CD95/Fas*, *TNFR1*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3* и *DR4/5* в клетках линий меланомы *mel Kor*, *mel Z*, *mel Mtp*, *mel Mtp-X*, *mel Ibr*, *mel Ch*, *mel Is* и *mel R*.

Материалы и методы. Клеточные линии меланомы человека инкубировали с 2 лекарственными формами аранозы — лиофилизатом для приготовления раствора для инъекций и липосомальной. В количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени исследовали уровень экспрессии генов *DR3*, *DR4/5*, *CD95/Fas*, *TNFR1*, *TNFR2* и *TRAIL*. Уровень экспрессии рассчитывали количественно относительно уровня экспрессии гена *ABL*.

Результаты. Наиболее подверженным изменениям оказался уровень экспрессии мРНК гена *CD95/Fas*. Липосомальная форма аранозы повысила уровень экспрессии *CD95/Fas* в клетках линий *mel Ibr* и *mel Mtp-X* и понизила в клетках линий *mel Ch* и *mel Is*.

Выводы. Таким образом, липосомальная форма аранозы может влиять на устойчивость клеток линий меланомы к апоптозу.

Ключевые слова: мРНК, суперсемейство *TNFSFR*, *CD95/Fas*, апоптоз, липосомы, производные нитрозоалкилмочевины

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-34-39

LIPOSOMAL ARANOSE CAN CHANGE MRNA *CD95/FAS* EXPRESSION LEVEL IN MELANOMA CELL LINES

D.A. Afanasieva, V.A. Misyurin, A.V. Ponomarev, I.M. Luchenko, O.S. Burova, M.A. Baryshnikova

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Background. Aranose is alkylating antineoplastic agent with cytotoxic and cytostatic properties. Liposomal form of aranose has advantages compared with traditional dosage form. Another alkylating agent, cisplatin, promotes mRNA increase expression level of genes, which control external apoptosis way.

Objective. We assume that liposomal form of aranose can change the *CD95/Fas*, *TNFR1*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3* and *DR4/5* expression level in melanoma cell lines *mel Kor*, *mel Z*, *mel Mtp*, *mel Mtp-X*, *mel Ibr*, *mel Ch*, *mel Is* and *mel R*.

Materials and methods. There are two forms of aranose were used in this work: liposomal form and traditional diluted form for injection. Melanoma cell lines were incubated with both forms. We used RQ PCR to evaluate mRNA expression of *DR3*, *DR4/5*, *CD95/Fas*, *TNFR1*, *TNFR2* and *TRAIL* relatively gene *ABL*.

Results. *CD95/FAS* mRNA expression level was most changeable. Liposomal aranose increase *CD95/FAS* expression level in *mel Ibr* and *mel Mtp-X* cell lines and reduced *CD95/FAS* expression level in *mel Ch* and *mel Is*.

Conclusion. Thus, liposomal aranose can change mRNA *CD95/FAS* expression level in melanoma cell lines. Using this process, liposomal form can affect the apoptotic cell death of melanoma.

Key words: mRNA, *TNFSFR* superfamily, *CD95/Fas*, apoptosis, liposomes, nitrosoureas

Введение

Ранее было обнаружено, что липосомальные формы препаратов из класса нитрозомочевин, в частности аранозы и ормустина, оказывают цитотоксическое действие на клеточные линии, резистентные к традиционной инъекционной лекарственной фор-

ме — лиофилизату для приготовления раствора для инъекций [1]. В клетках резистентных культур не экспрессируется рецептор внешнего пути апоптоза *CD95/Fas* [2, 3]. На основании этого можно предположить, что в противоопухолевом эффекте аранозы-лио и ормустина-лио рецептор *CD95/Fas* играет

значимую роль, так как в его отсутствие клетка менее чувствительна к инициации внешнего пути апоптоза (клеточной гибели). Из данных литературы известно, что липосомальный цисплатин вызывает гибель опухолевых клеток, резистентных к относительно низким дозам химиопрепаратов, активируя экспрессию белков, ответственных за реализацию внешнего пути апоптоза [4, 5]. Внешний путь активации апоптоза начинается с контакта мембранных рецепторов суперсемейства TNFSFR, гомологичных друг другу, с собственными лигандами [6]. Потеря этих рецепторов часто становится причиной развития лекарственной резистентности опухолевых клеток. С другой стороны, восстановление исходного уровня экспрессии данных рецепторов на поверхности клетки может увеличить эффективность противоопухолевой терапии.

В связи с этим целью настоящей работы было исследование влияния липосомальной и свободной форм аранозы на активность генов, кодирующих рецепторы внешнего пути апоптоза *CD95/Fas*, *TNFR1*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3* и *DR4/5* в клетках линий меланомы *mel Kor*, *mel Z*, *mel Mtp*, *mel Mtp-X*, *mel Ibr*, *mel Ch*, *mel Is* и *mel R*.

Материалы и методы

Клеточные линии

Исследования проводили на 8 клеточных линиях диссеминированной меланомы человека: *mel Kor*, *mel Z*, *mel Mtp*, *mel Mtp-X*, *mel Ibr*, *mel Ch*, *mel Is* и *mel R*, полученных из банка клеточных культур ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 10 мМ NEPES, 2 мМ L-глутамин, пенициллин (25 000 Ед) – стрептомицин (25 000 мкг), пируват натрия, 0,1 % раствор аминокислот и 0,1 % раствор витаминов при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ (полная среда). Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3–4 дня.

Противоопухолевые препараты

Исследовали 2 лекарственных формы аранозы, препарата из группы нитрозоалкилмочевины:

- араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, 500 мг (араноза-лио), производства филиала «Наукопрофи» ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
- липосомальная лекарственная форма аранозы (липосомальная араноза), предоставленная лабораторией разработки лекарственных форм НИИ ЭДито ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Было изучено влияние аранозы-лио, липосомальной аранозы и пустых липосом на экспрессию мРНК

рецепторов апоптоза суперсемейства TNFSFR – *CD95/Fas*, *TNFR1*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3*, *DR4/5* в клетках линий меланомы человека. Клетки инкубировали с препаратами в концентрации 0,5 ИК50 в течение 72 часов.

Подготовка клеточного материала и выделение общей РНК

Клетки снимали с культуральных флаконов 0,02 % раствором Версена объемом 2 мл, содержащим 0,25 % трипсина. Клетки находились в трипсине 2 мин при постоянном наблюдении за их состоянием с помощью микроскопа. Добавляли 10 мл буфера STE (0,1 М NaCl, 1 М трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ ЭДТА) и центрифугировали в течение 5 мин при 800 об/мин. Удаляли супернатант, а клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл физиологического раствора и центрифугировали в течение 5 мин при 1200 об/мин. Из полученного осадка клеток далее выделяли РНК.

Выделение РНК из предварительно обработанных образцов производилось по протоколу, предложенному P. Chomczynski и N. Sacchi [7]. Подготовленный клеточный материал лизировали в 0,5 мл гуанидин-тиоционатного буфера (4 М тиоционата гуанидина, 25 мМ цитрата натрия, 0,5 % N-лаурилсаркозината натрия и 0,1 М меркаптоэтанола). Во время лизиса материал пропускали через иглу 19G не менее 20 раз. Далее в пробирку добавляли 0,5 мл водонасыщенного фенола (рН 5,2) и 0,125 мл раствора ацетата натрия (рН 4,2), встряхивали и добавляли 0,25 мл хлороформа. Полученную смесь встряхивали до молочно-белого цвета и центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 об/мин и охлаждении до 4 °С. После центрифугирования отбирали 0,65 мл верхней водной фазы, содержащей клеточную РНК, и смешивали с 0,65 мл изопропанола. Инкубирование РНК в изопропанолу проводилось в течение 20 ч при температуре –20 °С. После инкубирования РНК осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 12 000 об/мин, удаляли супернатант и 2 раза промывали в 80 % этаноле. После промывок осадок РНК высушивали в термостате в течение 20 мин при 37 °С, растворяли в 20 мкл деионизованной воды и измеряли концентрацию раствора.

Для синтеза кДНК с использованием ревертазы брали 2 мкг матричной РНК, выделенной на предыдущем этапе. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием фермента RevertAid Reverse и коммерческого набора реактивов (Fermentas, США) в условиях, предложенных фирмой-производителем. Для отжига использовали смесь случайных гексамеров («Синтол», Россия). В качестве отрицательного контроля использовали рабочую смесь без добавления РНК. Пробу доводили до конечного объема 120 мкл деионизованной водой.

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени

Количественную ПЦР в реальном времени проводили с использованием 2-кратной реакционной смеси (40 мМ трис-НСl, 100 мМ КСl, 4 мМ MgCl₂, 1 мМ каждого из 4 дезоксирибонуклеотидов и 0,2 мМ β-меркаптоэтанола) и Taq ДНК-полимеразы (Fermentas, США). В каждую пробу было добавлено 5 μl кДНК, 250 нМ прямого, 250 нМ обратного праймера и 140 нМ флуоресцентного зонда. Подбор праймеров и флуоресцентных зондов проводили с использованием программы Vector NTI 10 на основе данных нуклеотидных последовательностей генов *DR3*, *DR4/5*, *CD95/Fas*, *TNFR1*, *TNFR2* и *TRAIL*, доступных на интернет-ресурсе <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

В каждом образце был исследован уровень экспрессии генов *DR3*, *DR4/5*, *CD95/Fas*, *TNFR1*, *TNFR2* и *TRAIL*. Уровень экспрессии рассчитывали количественно относительно уровня экспрессии гена *ABL*.

Данный эксперимент проводили на приборе DTlite («ДНК-технология», Россия). Программа проведения реакций была следующей: предварительная обработка в течение 5 мин при 94 °С и 45 циклов денатурации в течение 10 с при 94 °С с последующим отжигом праймеров и синтезом в течение 12 с при 60 °С.

Для детекции флуоресценции был выбран канал Нех. Измерения велись по общепризнанной методике относительно гена *ABL*, уровень экспрессии которого был принят за 100 % [8]. В качестве положительного контроля использовали векторы рЕТ-15b, экспрессирующие клонированные геномные последовательности. Правильность синтезированных олигонуклеотидных последовательностей подтверждена секвенированием по Сэнгеру на анализаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Статистический анализ данных

Сравнение количественного уровня экспрессии генов в различных линиях проводили методом χ^2 в открытой статистической программе PAST 3. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Активность генов, кодирующих рецепторы апоптоза суперсемейства *TNFSFR* – *CD95/Fas*, *TNFR1*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3* и *DR4/5*, оценивали количественно в 8 клеточных линиях диссеминированной меланомы человека на основании уровня экспрессии мРНК (табл. 1).

Из табл. 1 видно, что в исследуемых клеточных культурах преобладала экспрессия мРНК *CD95/Fas*-рецептора. В клетках линий mel Ch, mel Ibr, mel Is и mel R наблюдался более высокий уровень экспрессии мРНК *CD95/Fas* (46,65; 17,68; 61,56 и 16,49 % соответственно), чем в клетках остальных линий. В клетках линии mel Ibr наблюдалась коэкспрессия мРНК *CD95/Fas* и *DR3* (на уровне 5 %). Гены других рецепторов инициации внешнего пути апоптоза в клетках большинства линий либо вообще не экспрессировались, либо были малоактивны. Так, в клетках линий mel Kor и mel Ibr наблюдалась экспрессия генов *TNFR2* и *TRAIL*, а в клетках линии mel Z – *DR3*.

Было изучено действие 2 лекарственных форм аранозы – аранозы-лио и липосомальной аранозы – и пустых липосом, не содержащих аранозу, на уровень экспрессии мРНК генов рецепторов суперсемейства *TNFSFR*. Данные лекарственные формы оказали различные эффекты на активность генов (табл. 2).

Наиболее чувствительными к препаратам оказались клетки линии mel Ibr. В них липосомальная араноза вызывала повышение уровня экспрессии мРНК

Таблица 1. Уровень экспрессии мРНК рецепторов апоптоза суперсемейства *TNFSFR* в клетках меланомы человека

Линия клеток	Уровень мРНК рецептора внешнего пути апоптоза, %*					
	<i>CD95/Fas</i>	<i>TNFR1</i>	<i>TNFR2</i>	<i>TRAIL</i>	<i>DR3</i>	<i>DR4/5</i>
mel Ch	46,65 ± 2,15	0	0	0	0	0
mel Ibr	17,68 ± 0,72	0	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	5,08 ± 0,2	0
mel Is	61,56 ± 2,74	0	0	0	0	0
mel Kor	2,72 ± 0,13	0	0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0	0
mel Mtp	2,72 ± 0,14	0	0	0	0	0
mel Mtp-X	0,96 ± 0,03	0	0	0	0	0
mel R	16,49 ± 0,73	0	0	0	0	0
mel Z	0,32 ± 0,01	0	0	0	0,32 ± 0,01	0

*Измерения проводили относительно гена *ABL*, уровень экспрессии которого был принят за 100 %.

Таблица 2. Влияние аранозы-лио, липосомальной аранозы и пустых липосом на экспрессию мРНК рецепторов клеточной гибели суперсемейства TNFSFR

Линия клеток	Препарат	Уровень мРНК рецептора внеклеточного пути апоптоза, %*					
		DR3	DR4/5	CD95/Fas	TNFR1	TNFR2	TRAIL
mel Ibr	ПЛ	1,18 ± 0,04**	0	18,95 ± 1,08	0	23,33 ± 0,95*	0,03 ± 0,01
	ЛА	0	0	348,22 ± 21,4*	0	0,84 ± 0,03*	0,84 ± 0,03*
	А	5,83 ± 0,53	0	87,06 ± 2,07*	0	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02
	Контроль	5,08 ± 0,14	0	17,68 ± 0,92	0	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01
mel Kor	ПЛ	0,17 ± 0,02	0	12,50 ± 0,87*	0	0,34 ± 0,01*	0,34 ± 0,01*
	ЛА	0	0	20,31 ± 1,14*	0	0,73 ± 0,02*	0,73 ± 0,03*
	А	0	0	20,31 ± 2,04*	0	0,52 ± 0,02*	0,52 ± 0,02*
	Контроль	0	0	2,72 ± 0,04	0	0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,01
mel Mtp	ПЛ	0	0	3,85 ± 0,19*	0	0	0
	ЛА	0	0	1,27 ± 0,03*	0	0	0
	А	0	0	0,90 ± 0,05*	0	0	0
	Контроль	0	0	2,72 ± 0,06	0	0	0
mel Mtp-X	ПЛ	0	0	1,36 ± 0,03*	0	0	0
	ЛА	0	0	7,69 ± 0,29*	0	0	0
	А	0	0	2,72 ± 0,01*	0	0	0
	Контроль	0	0	0,96 ± 0,07	0	0	0
mel Z	ПЛ	0,02 ± 0,01*	0	0,18 ± 0,03*	0	0	0
	ЛА	0,42 ± 0,02	0	0,42 ± 0,02*	0	0	0
	А	0,55 ± 0,09	0	0,55 ± 0,06*	0	0	0
	Контроль	0,32 ± 0,04	0	0,32 ± 0,04	0	0	0
mel Ch	ПЛ	2,06 ± 0,11*	0	7,69 ± 0,31*	0	0	0
	ЛА	1,79 ± 0,07*	0	3,59 ± 0,12*	0	0	0
	А	0	0	7,69 ± 0,31*	0	0	0
	Контроль	1,46 ± 0,06	0	46,65 ± 2,13	0	0	0
mel Is	ПЛ	0	0,34 ± 0,01	6,25 ± 0,24*	0	0	0
	ЛА	0,84 ± 0,03	0	12,50 ± 0,45*	0	0	0
	А	0	0,28 ± 0,01	0	0	0	0
	Контроль	0,90 ± 0,03	0	61,56 ± 2,78	0	0	0
mel R	ПЛ	1,03 ± 0,04*	0	18,95 ± 0,67	0	0	0
	ЛА	0,55 ± 0,02*	0	21,76 ± 0,87*	0	0	0
	А	0,59 ± 0,02*	0	21,76 ± 0,79*	0	0	0
	Контроль	0,10 ± 0,01	0	16,49 ± 0,56	0	0	0

Примечание. ПЛ – пустые липосомы; ЛА – липосомальная араноза; А – араноза-лио. * Измерения велись относительно гена ABL, уровень экспрессии которого был принят за 100 %; ** $p < 0,05$ относительно контроля

CD95/Fas-рецептора в 20 раз по сравнению с контролем – до 348 %, тогда как в контроле экспрессия мРНК составляла 17,68 %. Араноза-лио также вызывала повышение уровня экспрессии мРНК CD95/Fas в 5 раз по сравнению с контролем – до 87 %. Кроме

того, в клетках mel Ibr зарегистрировано повышение уровня экспрессии мРНК рецептора TNFR2 до 23,33 % после инкубирования с пустыми липосомами. Во всех оставшихся линиях пустые липосомы не влияли на экспрессию мРНК рецепторов внешнего пути апоптоза.

После инкубации с исследуемыми препаратами произошли значительные изменения только уровня экспрессии мРНК *CD95/Fas*. В клетках линии *mel Kor* обе лекарственные формы аранозы вызвали повышение экспрессии мРНК *CD95/Fas* в 10 раз по сравнению с контролем — до 20 %. В клетках линии *mel Mtp-X*, в которых изначально отсутствовала мРНК *CD95/Fas*, после взаимодействия с липосомальной аранозой экспрессия мРНК *CD95/Fas* повышалась на 7,69 %, а после инкубации с аранозой-лио — до 2,72 %. В клетках линии *mel R*, изначально имеющих достаточно высокий уровень экспрессии мРНК *CD95/Fas* (16,49 %), он незначительно и в одинаковой степени повышался после инкубации с обеими лекарственными формами (до 21,76 %). В клетках линии *mel Z* уровень экспрессии мРНК *CD95/Fas* был очень низким как в контроле, так и после инкубации с препаратами. В клетках линии *mel Mtp*, несмотря на наличие на поверхности рецептора *CD95/Fas*, наблюдали небольшой процент экспрессии мРНК *CD95/Fas*, который снижался после инкубации с обеими лекарственными формами аранозы, но повышался после инкубации с пустыми липосомами. В клетках линий *mel Ch* и *mel Is*, у которых изначально наблюдался высокий уровень экспрессии мРНК *CD95/Fas*, под влиянием препаратов он значительно снизился.

Обсуждение

Согласно данным литературы утрата *CD95/Fas*-рецептора приводит к устойчивости клетки к химиопрепаратам [9–15]. Предполагалось, что *CD95/Fas*-рецептор необходим для реализации механизма действия традиционных лекарственных форм противоопухолевых препаратов, но оставалось неясным, каким образом действует липосомальная лекарственная форма препарата.

М. Koch и соавт. изучали механизмы резистентности к цисплатину, который, как и араноза, относится к алкилирующим агентам и вызывает гибель клеток через повреждение их ДНК. По данным первых наблюдений, эффективность действия препарата или, наоборот, резистентность клеток линии рака яичников к цисплатину не коррелирует со степенью повреждения их ДНК. М. Koch и соавт. заключили, что липосомальный цисплатин в отличие от свободного препарата вызывает гибель резистентных опухолевых клеток, активируя внешний путь апоптоза через TNF-рецептор [4, 16]. Позже эта группа исследователей обнаружила, что при действии липосомального цисплатина повышается активность генов, ответственных за реализацию внешнего пути апоптоза [5]. Цисплатин в свободной форме, наоборот, стимулирует работу систем, ответственных за развитие апоптоза по внутриклеточному пути. Хотя М. Koch и соавт. не исследовали все белки-участники процес-

са апоптоза, они убедительно показали, что липосомальная форма алкилирующего агента обладает значительным цитостатическим эффектом.

Мы предположили, что липосомальная форма аранозы может активировать экспрессию генов рецепторов внешнего пути апоптоза в клетках линий меланомы, как это было показано в работе с липосомальным цисплатином [4, 5]. Для этого мы изучили уровень экспрессии мРНК рецепторов внешнего пути апоптоза и его изменение после инкубирования с традиционной и липосомальной лекарственными формами аранозы. В результате было обнаружено, что в исходных клетках линий диссеминированной меланомы человека из всех рецепторов внешнего пути апоптоза в основном активен *CD95/Fas*-рецептор. Он присутствует в 6 из 8 исследованных клеточных линий: *mel Ch*, *mel Ibr*, *mel Is*, *mel Kor*, *mel Mtp* и *mel R*. В клетках линий *mel Mtp-X* и *mel Z* экспрессия мРНК рецепторов внешнего пути апоптоза не наблюдалась.

В 7 из 8 исследованных клеточных линий меланомы после инкубирования с различными лекарственными формами аранозы менялся уровень экспрессии мРНК гена *CD95/Fas*. В некоторых случаях (линии *mel Ibr* и *mel Mtp-X*) липосомальная араноза вызывала более выраженное повышение уровня экспрессии *CD95/Fas*, чем араноза-лио. В других случаях (линии *mel Ch* и *mel Is*) уровень экспрессии *CD95/Fas* в присутствии липосомальной формы аранозы снижался. Возможно, сделанное ранее предположение о том, что липосомальная араноза не использует *CD95/Fas*-рецепторный путь [2], требует уточнения, а именно: это может происходить не в каждой линии клеток.

Линии, в которых наблюдались эффекты понижения или повышения уровня экспрессии гена *CD95/Fas*, относятся к низкодифференцированным [17]. Для низкодифференцированных линий характерны значительное количество генетических аномалий и большая резистентность к противоопухолевым препаратам. Эффект повышения уровня экспрессии гена *CD95/Fas* может быть предиктором высокой эффективности липосомальной лекарственной формы, по крайней мере для части высокозлокачественных клеток.

Заключение

Обе лекарственные формы аранозы приводят к различным эффектам, в том числе к повышению и понижению уровня экспрессии мРНК гена *CD95/Fas*. Данные эффекты наблюдаются в основном в низкодифференцированных линиях меланомы. Стимулирование экспрессии гена *CD95/Fas* имеет большое значение для разработки новых терапевтических подходов, основанных на применении липосомальной формы аранозы, так как они позволяют рассчитывать на понижение устойчивости опухолевой клетки к апоптозу.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Грищенко Н.В., Альбассит Б., Барышникова М.А. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм противоопухолевых препаратов из класса нитрозомочевины. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(1):49–53.
2. Грищенко Н.В., Барышникова М.А., Полозкова А.П. и др. Липосомальные противоопухолевые препараты не используют CD95-зависимый сигнальный путь апоптоза. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(1):37–42.
3. Барышникова М.А., Грищенко Н.В., Бурова О.С. и др. Роль CD95/Fas-рецептора в индукции апоптоза противоопухолевыми препаратами. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(3):3–7.
4. Koch M., Krieger M.L., Stolting D. et al. Overcoming chemotherapy resistance of ovarian cancer cells by liposomal cisplatin: Molecular mechanisms unveiled by gene expression profiling. *Biochem Pharmacol* 2013;85(8):1077–90. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.01.028. Epub 2013 Feb 8. PMID: 23396090.
5. Stölting D.P., Koch M., Wiese M. et al. Liposomal cisplatin can overcome chemotherapy resistance of A2780 ovarian cancer cells by inducing the extrinsic apoptotic pathway. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2014;52(1):78–81. DOI: 10.5414/CPXCES13EA03. PMID: 24290409.
6. Мисюрин В.А. Структура и свойства основных рецепторов и лигандов внешнего пути апоптоза. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(2):23–30.
7. Chomczynski P., Sacchi N. The singlestep method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty something years on. *Nat Protoc* 2006;1(2):581–5. PMID: 17406285.
8. Moore F.R., Rempfer C.B., Press R.D. Quantitative BCR-ABL1 RQ-PCR fusion transcript monitoring in chronic myelogenous leukemia. *Methods Mol Biol* 2013;999:1–23. DOI: 10.1007/978-1-62703-357-2_1. PMID: 23666687.
9. Блохин Д.Ю., Власенкова Н.К., Герасимова Г.К. и др. Поиск молекулярных механизмов обеспечения множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. *Российский биотерапевтический журнал* 2013;12(2):10.
10. Блохин Д.Ю., Соколовская А.А., Власенкова Н.К. и др. Множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток, резистентных к апоптозу. *Вестник РАМН* 2007;10:41–6.
11. Блохин Д.Ю., Чмутин Е.Ф., Иванов П.К. Молекулярные мишени для противоопухолевой терапии: факторы роста, ангиогенеза и апоптоза. *Российский биотерапевтический журнал* 2011;10(3):25–30.
12. Славина Е.Г., Бигвава Х.А., Заботина Т.Н. и др. Модификация фактором некроза опухоли(ФНО-альфа) цитотоксического и апоптотического действия противоопухолевых лекарств в клетках меланомы человека. *Российский биотерапевтический журнал* 2009;8(4):37–44.
13. Соколовская А.А., Заботина Т.Н., Блохин Д.Ю., Барышников А.Ю. Идентификация лекарственно-индуцированного апоптоза в лейкозных клетках. *Медицинская иммунология* 1999;1(3–4):109.
14. Sokolovskaya A.A., Zabolina T.N., Blokhin D.Yu. et al. CD95-deficient cells of Jurkat/A4 subline are resistant to drug-induced apoptosis. *Experimental Oncology* 2001;23(3):175–181.
15. Sokolovskaya A.A., Zabolina T.N., Blokhin D.Yu. et al. Comparative analysis of apoptosis induced by various anticancer drugs in Jurkat cells. *Experimental Oncology* 2001;23(1):46–50.
16. Kreiger M.L., Eckstein N., Schneider V. et al. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeted liposomes in vitro. *Int J Pharm* 2010;389(1–2):10–7. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.12.061. Epub 2010 Jan 7. PMID: 20060458.
17. Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Бурова О.С. и др. Экспрессия раковотестикулярных антигенов в клетках меланомы человека. *Сибирский онкологический журнал* 2010;37(1):29–39.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОДКОЖНОГО КСЕНОГРАФТА МЕЛАНОМЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА MEL RAC С МУТАЦИЕЙ NRAS НА ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ МЫШАХ ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ ТАРГЕТНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СРЕДСТВ

Н.В. Андропова, С.М. Ситдикова, Л.Ф. Морозова, А.А. Лушникова, Д.А. Понкратова,
И.Н. Михайлова, Н.Т. Райхлин, И.А. Букаева, Е.М. Трещалина

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Сурия Мансуровна Ситдикова suriyasitdikova@yandex.ru

Введение. Разработка новых моделей диссеминированной меланомы кожи человека с наличием молекулярно-генетической мишени для таргетной терапии повышает результативность доклинических исследований *in vitro* и *in vivo* новых антимеланомных средств и их комбинаций. Такая возможность реализована путем адаптации к росту *in vivo* оригинальной линии клеток беспигментной меланомы кожи человека *mel Rac* и получению подкожного (п/к) ксенографта под контролем трансплантационных, морфологических, молекулярно-генетических (мутация NRAS) и химиотерапевтических (чувствительность к траметинибу, ингибитору NRAS) характеристик.

Цель исследования — получение из линии клеток *mel Rac* п/к ксенографта беспигментной меланомы кожи человека с мутацией NRAS, чувствительной к специфической таргетной терапии.

Материалы и методы. Использована линия клеток пигментированной беспигментной меланомы кожи человека *mel Rac* из коллекции РОИЦ и иммунодефицитные мыши-самки *Balb/c nude* разведения РОИЦ. Искомые характеристики определены при многократном п/к трансплантации *in vivo* с помощью методов трансплантационной биологии, световой микроскопии, молекулярной генетики и экспериментальной химиотерапии. Чувствительность к ингибитору NRAS мутации оценена под контролем скорости роста опухоли (V_t/V_0) по адекватным для пациентов показателям: наличие полной ремиссии и возможность рецидива.

Результаты. При п/к трансплантации 10^7 клеток линии *mel Rac* получены цитологически идентичные перевиваемые п/к ксенографты с устойчивой кинетикой роста на 4–9-м пассажах (латентная фаза — 8 сут, экспоненциальная — до 14 сут, стационарная — до 24 сут) и наличием мутации NRAS. Траметиниб в разовой дозе 0,3 мг/кг вызвал полную ремиссию в течение 14 сут и в течение 7 сут после его отмены без рецидива.

Выводы. Полученный с линией клеток беспигментной меланомы кожи человека *mel Rac*, чувствительный к траметинибу п/к ксенографт с мутацией NRAS пригоден для доклинического изучения новых противомеланомных средств, направленных на эту мишень.

Ключевые слова: беспигментная меланома кожи человека, NRAS мутация, подкожный ксенографт, иммунодефицитные мыши

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-40-46

MODELING OF A SUBCUTANEOUS XENOGRATF OF HUMAN MELANOMA SKIN MEL RAC WITH NRAS MUTATION ON IMMUNODEFICIENT MICE FOR PRECLINICAL STUDYING THE TARGETING ANTICANCER DRUGS

N. V. Andronova, S. M. Sitdikova, L. F. Morozova, A. A. Lushnikova, D. A. Ponkratova,
I. N. Mikhailova, N. T. Raychlin, I. A. Bukaeva, H. M. Treshalina

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Background. Development of new models of a human disseminative melanoma of skin with existence of a molecular and genetic target for specific therapy increases productivity of the preclinical researches *in vitro* and *in vivo* new the anti-melanoma drugs or their combinations. Such opportunity is realized by adaptation to *in vivo* of the original human pigment-free skin melanoma cell line *mel Rac* and receiving s. c. xenograft under monitoring, transplant, morphological, molecular and genetic (NRAS mutation) and chemotherapeutic (sensitivity to an inhibitor of NRAS a trametinib) characteristics.

Objective. Receiving from the cell line *mel Rac* s. c. xenograft of a human pigmented melanoma of skin with a mutation of NRAS and sensitive to specific target therapy.

Materials and methods. Human pigment-free skin melanoma cell line mel Rac from the Collection of Russian Cancer Research Center and immunodeficient female of Balb/c nude mice cultivation of Russian Cancer Research Center was used. Required characteristics are defined at a multiple s. c. transplanting in vivo by methods of transplant biology, a light microscopy, molecular genetics and the experimental chemotherapy. Sensitivity to a NRAS inhibitor to a trametinib was estimated under monitoring of rate of the tumor growth (V_t/V_0) on indexes, adequate for patients: existence of the complete remission and possibility of recurrence.

Results. At s. c. transplantation of 10^7 cell of mel Rac line are received cytological identical intertwined s. c. xenografts with a stable kinetics of growth on 4–9 passages (a latent phase 8 days, exponential – to 14 days, stationary – to 24 days) and existence of a mutation of NRAS. Trametinib in a single dose of 0,3 mg/kg caused the complete remission during a 14-day course and within 7 days after its cancellation without recurrence.

Conclusion. Receiving with cell line mel Rac s. c. xenograft of a human pigment-free melanoma of skin with a mutation of NRAS and sensitive to specific target therapy is suitable for preclinical studying of the specific for this target new anti-melanoma drugs.

Key words: human pigment-free melanoma skin, NRAS mutation, subcutaneous xenograft, immunodeficient mice

Введение

Диссемированная меланома кожи человека, особенно беспи́гментная, отличается чрезвычайно низкой чувствительностью к различным видам терапии [1]. Важным фактором в исследованиях по созданию таргетных антимеланомных препаратов является повышенная активность митогенактивируемых протеинкиназ (МАРК) сигнального пути RAS/RAF/MEK/ERK, сопряженная с наличием мутаций. Среди последних в 15–20 % первичных и метастатических меланом обнаружена мутация NRAS, следствие замены в кодоне 61 экзона 3 Q61R гена NRAS, кодирующего малую ГТФазу [2–4]. Большинство мутаций NRAS (80 %) реализуются в результате замены в кодоне 61 экзона 3 (Q61K и Q61R) и приводят к образованию aberrантной формы белка, который не может гидролизовать RAS-ГТФ и остается гиперактивным. Эти мутации ассоциированы с онкогенезом на ранних стадиях развития меланомы, в частности, их несут около 80 % врожденных невусов, в доброкачественных опухолях они встречаются редко [5]. Мутации в экзоне 3 NRAS обнаруживаются на более поздних этапах развития болезни и, как предполагают, участвуют в метастазировании меланомы. Мутации NRAS нередко выявляются, в том числе в метастазах меланомы, после терапии BRAF-ингибиторами [6].

Антимеланомные ингибиторы мутации NRAS пока находятся в стадии доклинической или клинической разработки [5, 7, 8]. При таргетной терапии больных метастатической меланомой с мутацией гена NRAS селективными ингибиторами киназ MEK1 и MEK2, препаратами MEK 162 и траметинибом (мекинист) получены обнадеживающие результаты [9]. Интенсивное развитие проблемы определяет актуальность создания адекватных моделей *in vivo* для доклинической оценки эффективности новых NRAS-направленных антимеланомных агентов.

Пригодной для получения подкожных (п/к) ксенографтов для доклинического изучения противоопухолевых средств является клеточная линия беспи́гментной меланомы кожи человека mel Rac, депонированная

в специализированной коллекции клеточных культур РККК (П) 704Д Института цитологии РАН [2]. Эта линия имеет соответствующие онкологическому профилю стабильные культуральные, морфологические и индивидуальные фенотипические характеристики, представленные дифференцированными антигенами CD63, HMW, отрицательными MelanA, HMB45 и Tyrosinase, положительными маркерами на уровне МРНК раково-тестикулярного семейства MAGE, а также антигенами гистосовместимости I и II классов. Линия mel Rac имеет достаточно высокий митотический потенциал, позволяющий получить солидный рост *in vivo* при результативной трансплантационной адаптации [10]. В коллекции штаммов опухолей человека формируется панель штаммов меланомы с различными мутациями, определяющими современную таргетную терапию диссемированной меланомы кожи человека [11]. Нами получены линия клеток и п/к ксенографты пигментированной меланомы mel Cher с мутацией BRAF V600E, высокочувствительные к вемурафенибу [12]. В качестве 2-й модели для доклинического изучения таргетных антимеланомных препаратов при наличии мутации NRAS рассматривается п/к ксенографт беспи́гментной меланомы кожи человека mel Rac, полученный из адекватной по биологическим характеристикам линии клеток.

Цель исследования – получение из линии клеток mel Rac п/к ксенографта беспи́гментной меланомы кожи человека с мутацией NRAS, чувствительной к специфической таргетной терапии.

Задачи исследования:

- Определение мутации NRAS в клеточной линии mel Rac.
- Адаптация клеточной линии mel Rac к росту *in vivo* под контролем прививаемости и стабильной кинетики.
- Верификации гистологической идентичности и наличия мутации NRAS в срезах п/к ксенографтов и в клетках линии mel Rac.
- Оценка лекарственной чувствительности к траметинибу п/к ксенографтов mel Rac.

Материалы и методы

Определение мутации *NRAS* в клетках и срезах п/к ксенографтов *mel Ras*

Выделение ДНК

Монослой клеток, растущих в стандартных культуральных флаконах, покрывали слоем Версена («ПанЭко», Москва) в концентрации 3 мл на 25 см² поверхности клеток и инкубировали 5 мин при 37 °С. После отделения клеток от подложки их собирали в центрифужные пробирки с 1–2 мл среды, диспергировали и осаждали центрифугированием при 200 g 5 мин. Осадок клеток объемом около 100–200 мкл переносили в микропробирку объемом 1,5 мл, гомогенизировали в лизирующем буфере из набора «Амплипрайм ДНК-сорб-В» («НекстБио», Москва), инкубировали в термостате при 65 °С в течение 15 мин, затем в микропробирку с гомогенатом вносили 25 мкл предварительно гомогенизированного сорбента из указанного набора и инкубировали 10 мин при комнатной температуре, осаждали центрифугированием при 13000 g 15 с и тщательно промывали осадок буфером № 1 (300 мкл), затем осаждали аналогичным образом и 3 раза повторяли процедуру отмывки буфером № 2 (по 500 мкл) с осаждением. Осадок высушивали при 65 °С в течение 7–10 мин и диспергировали в 50 мкл буфера для разведения, инкубировали при 65 °С 10 мин, осаждали при 13 000 g 1 мин. Хранили раствор ДНК при –20 °С.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Для поиска соматических мутаций в экзонах 2 и 3 гена *NRAS* использовали ПЦР со специфичными праймерами. Праймеры к экзону 2, в котором была обнаружена мутация *NRAS* р. Q61R (с.182A>G), следующие:

Ex2NR_For 5' – AAT TGA ACT TCC CTC CCT CCC T-3',

Ex2NR_Rev 5' – TGT CCT CAT GTA TTG GTC TCT C-3',

shEx2NS_rev 5' – GTC TCT CAT GGC ACT GTA CTC T-3'.

ПЦР проводили в объеме 25 мкл реакционной смеси по следующей схеме: к 10 нг ДНК добавляли по 1 мМ олигонуклеотидных праймеров, по 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, 3 % формамида и 2,5 мкл 10-кратного буфера для ПЦР следующего состава: 500 мМ KCl, 100 мМ трис-HCl pH 8,4, 15 мМ MgCl₂, деионизированной воды до 25 мкл.

ПЦР проводили в следующем режиме: начальная денатурация – при 94 °С, в течение 5 мин, затем в смесь добавляли HotStart ДНК-полимеразу (1 Ед активности) и выполняли 40 циклов ПЦР: денатурация при 94 °С – 25 с, отжиг при 64 °С – 30 с, элонгация при 72 °С – 30 с, и далее при 72 °С в течение 10 мин, хранение при 4 °С.

Второй раунд ПЦР проводили с использованием праймера shEx2NS_rev в режиме: 94 °С – 1 мин; затем 15 циклов: 94 °С – 30 с, 64 °С – 30 с, 72 °С – 30 с, затем терминация при 72 °С – 10 мин.

Электрофорез ПЦР-продуктов в агарозном геле

ПЦР-продукты выявляли в 2 % агарозном геле при U = 120 В. Полосу, соответствующую последовательности экзона 2 гена *NRAS* длиной 143 п. н., вырезали из геля и выделяли ДНК с помощью набора Wizard®PCR Preps DNA Purification System (Promega, США).

Секвенирование ПЦР-продукта

Аmplифицированную ДНК секвенировали на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США) по протоколам фирмы-производителя в режиме фрагментного анализа. Для анализа результатов ПЦР-анализа использовали компьютерную программу Chromas или GeneMapper.

Адаптация клеточной линии *mel Ras*

к росту *in vivo*

Инокулятом для имплантации служила культивированная в CO₂ клеточная линия описанной выше беспигментной меланомы кожи человека *mel Ras*. Инокулят для имплантации мышам готовили из клеток, отмытых физиологическим раствором от культуральной среды и помещенных в питательную среду 199.

Для получения п/к ксенографтов использованы 120 половозрелых 6–8 нед иммунодефицитных мышшей обоих полов Balb/c nude конвенционального содержания [13], которым вводили инокулят п/к в правый бок по 0,1 × 10⁷, 0,5 × 10⁷ или 1,0 × 10⁷ клеток на мышшь (нулевой пассаж, n = 3, 3 и 6 соответственно) в 0,2 мл питательной среды 199.

Прививаемость клеток контролировали по наличию пальпируемых опухолей у мышшей с регистрацией длительности латентного периода до 20 сут и измерением опухолей с помощью электронного штангенциркуля. По окончании исследования определяли оптимальную прививочную дозу, обеспечивающую 100 % прививаемость и наиболее короткий латентный период.

Повторную трансплантацию (пассажи 1–9) выполняли взвесью опухолевой ткани предшествующих пассажей, которую инокулировали мышсам (n = 6) по 50 мг в разведении 1:20 питательной средой 199. О кинетике роста п/к ксенографтов судили по результатам измерения в течение 2–4 нед каждые 3–4 сут с помощью электронного штангенциркуля. Период 2-кратного и более увеличения среднего объема опухоли (V_{cp} = a × b × c) определял длительность экспоненциальной фазы роста, а стабилизация роста опухоли на уровне менее 2-кратного увеличения – длительность

ность стационарной фазы роста. Кратность прироста опухоли рассчитывали по соотношению последующего среднего объема к предыдущему (V_t/V_{t-1}). Отсутствие значимых различий кривых роста опухоли 2 смежных пассажей в полупологарифмической системе координат подтверждало устойчивость кинетических характеристик п/к ксенографтов меланомы кожи человека mel Ras у мышей Balb/c nude.

Для подтверждения идентичности клеточного состава п/к ксенографтов и клеточной линии беспигментной меланомы кожи человека mel Ras опухолевые узлы 9-го пассажа с устойчивой кинетикой роста подвергали гистологическому исследованию методом световой микроскопии («Поливар», Австрия) после окрашивания их срезов гематоксилином и эозином.

Статистический анализ параметров роста пассажа выполняли с помощью стандартного метода Фишера. Отсутствие значимых различий кривых роста опухоли 2 пассажей в полупологарифмической системе координат подтверждало устойчивость кинетических характеристик роста п/к ксенографтов беспигментной меланомы кожи человека mel Ras у мышей Balb/c nude.

Чувствительность п/к ксенографтов меланомы кожи человека mel Ras к траметинибу

Траметиниб вводили в желудок мышам ($n = 10$) по известной схеме: ежедневно с 4-х по 17-е сутки после трансплантации опухоли в разовой дозе 0,3 мг/кг [7]. Контроль роста опухоли в динамике осуществляли в этой группе и в равночисленной группе без специфического лечения до начала (нулевые сутки) и 3-кратно после окончания курса вплоть до 28-х сут роста опухоли. Динамику роста опухоли в обеих группах оценивали на 8, 13, 18, 23 и 28-е сут на фоне и после введения траметиниба. Статистический анализ выполняли с помощью стандартного метода Фишера.

Результаты исследования

Мутацию *NRAS* p. Q61R (с. 182A>G) определяли предварительно в клеточной линии беспигментной меланомы кожи человека mel Ras и затем в полученных нами п/к ксенографтах меланомы кожи человека mel Ras 9-го пассажа со стабильной кинетикой роста на пике экспоненциальной фазы.

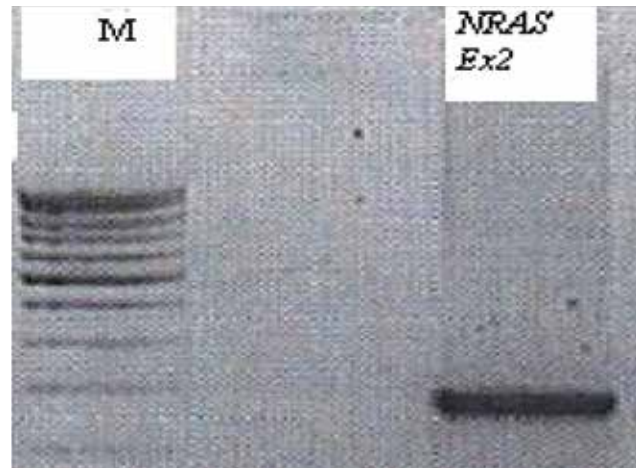


Рис. 1. Результат анализа ампликона (ПЦР-продукта) длиной 143 п. н., соответствующего экзону 2 гена *NRAS* в агарозном геле

По результатам ПЦР геномной ДНК получен ампликон длиной 143 п. н., соответствующий экзону 2 гена *NRAS* (рис. 1). При секвенировании ПЦР-продукта обнаружена мутация *NRAS* p. Q61R (с. 182A>G) (рис. 2).

Оценка прививаемости mel Ras после п/к имплантации разного числа клеток показала, что оптимальной является прививочная доза $1,0 \times 10^7$ клеток на мыш, приводящая к 100 % выходу пальпируемых опухолевых узлов (нулевой пассаж) через 11 сут после имплантации (латентный период) (табл. 1). Повторное пассирование показало, что на ранних пассажах (1–3) рост п/к опухолевых узлов остается относительно медленным: на 12-е сутки $V_{op} = 14,2 \pm 6,0$ мм³, на 15-е сутки – $110,7 \pm 47,0$ мм³. К 20-м сут объем опухоли достиг $675,3 \pm 433,0$ мм³. Соответственно,

Таблица 1. Выбор оптимальной прививочной дозы клеток беспигментной меланомы кожи человека mel Ras для получения подкожных ксенографтов у мышей-самок Balb/c nude на нулевом пассаже

Количество клеток на мыш	Отношение количества мышей с опухолью к общему количеству мышей	Латентный период, сут
$0,1 \times 10^7$	2/3	17
$0,5 \times 10^7$	3/3	12
$1,0 \times 10^7$	6/6	11

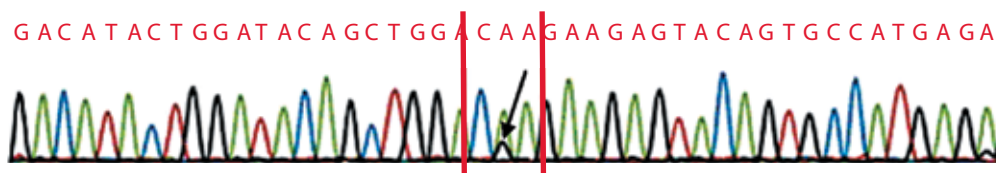


Рис. 2. Результат секвенирования ПЦР-продукта с мутацией *NRAS* p. Q61R (с. 182A>G) в ДНК, выделенной из клеток линии mel Ras и соответствующей экзону 2 гена *NRAS*

фаза экспоненциального роста практически отсутствовала до 20-х суток, а окончательный размер опухоли, несмотря на ее увеличение в 6,1 раза, составил $V_{cp} < 1,0 \text{ см}^3$ (табл. 2).

Таблица 2. Показатели роста подкожных опухолевых узлов беспигментной меланомы кожи человека *mel Ras* у мышей *Balb/c nude* на 1-м пассаже

Номер мыши	Объем п/к опухолевых узлов после трансплантации взвеси, мм ³		
	12-е сутки	15-е сутки	20-е сутки
1	16	72	216
2	20	108	1224
3	15	144	850
4	12	70	252
5	6	90	560
6	16	180	950
Показатель роста опухоли			
V_{cp}^*	14,2 ± 6,0	110,7 ± 47,0	675,3 ± 433,0
V_t/V_{t-1}^{**}	1,0	7,9	6,1

Примечание. Здесь и в табл. 3, 4: * Средний объем опухоли.

**Соотношение средних объемов опухоли последующего и предыдущего (скорость роста).

На 4-м пассаже динамика роста опухолей прогрессивно изменялась (табл. 3). Латентная фаза сократилась до 7 сут с достижением $V_{cp} = 40,0 \pm 19,0 \text{ мм}^3$, что почти в 3 раза больше объема опухоли 1-го пассажа. Далее на 14-е сутки $V_{cp} = 293,0 \pm 202,0 \text{ мм}^3$ (кратность прироста 7,3), а на 19-е сутки $V_{cp} = 1048,0 \pm 444,0 \text{ мм}^3$, кратность прироста опухоли относительно 1-го пассажа 1,6 раза – соответственно стационарной фазе роста.

Устойчивая динамика роста опухоли, достигнутая к 4-му пассажу, сохранялась до 9-го пассажа с близкими временными характеристиками: латентная фаза – до 8 сут, $V_{cp} = 135,5 \pm 65,0 \text{ мм}^3$; экспоненциальная фаза – до 14 сут, $V_{cp} = 527,6 \pm 174,0 \text{ мм}^3$, стационарная фаза – до 19 сут, $V_{cp} = 1353,7 \pm 543,0 \text{ мм}^3$ (табл. 4).

Гистологическая картина п/к ксенографтов 9-го пассажа на 19-е сутки роста показала, что клеточный состав идентичен культуре клеток беспигментной меланомы кожи человека *mel Ras* (см. рис. 3, 4). Опухоль состоит из полиморфных клеток различных размеров и форм (округлых, овальных, веретенообразных). Ядра крупные, содержат ядрышки. Цитоплазма опухолевых клеток на большинстве участков темная, в отдельных местах светлая. Пигмент в опухолевых клетках не обнаружен. Опухолевые клетки образуют солидные поля, местами формируют тяжи различного размера, ячейки и альвеолярно-подоб-

Таблица 3. Показатели роста подкожных опухолевых узлов беспигментной меланомы кожи человека *mel Ras* у мышей-самок *Balb/c nude* на 4-м пассаже

Номер мыши	Объем п/к опухолевых узлов после трансплантации взвеси, мм ³		
	7	14	19
1	30	330	1008
2	45	300	1440
3	45	560	1680
4	28	100	672
5	24	90	648
6	68	378	840
Показатель роста опухоли			
V_{cp}^*	40 ± 19	293 ± 202	1048 ± 444
V_t/V_{t-1}^{**}	1,0	7,3	3,6

Таблица 4. Показатели роста подкожных опухолевых узлов беспигментной меланомы кожи человека *mel Ras* у мышей-самок *Balb/c nude*, 9-й пассаж

Номер мыши	Объем п/к опухолевых узлов после трансплантации взвеси, мм ³		
	8-е сутки	14-е сутки	19-е сутки
1	100	360	1105
2	90	351	1330
3	140	630	1750
4	135	765	2112
5	108	484	850
6	240	576	975
Показатель роста опухоли			
V_{cp}^*	135,5 ± 65,0	527,6 ± 174,0	1353,7 ± 543,0
V_t/V_{t-1}^{**}	1,0	3,9	2,6

ные структуры, разделенные на отдельные дольки тонкими соединительно-тканными прослойками. В опухоли встречается много митозов – до 5–7 в так называемых горячих точках. Участки некрозов в опухоли единичные, мелкие. В отдельных местах по периферии опухолевого узла располагается жировая и мышечная ткань, в которую он прорастает. Опухолевый узел крупный, диаметром 0,8–1,0 см. Проведенное гистологическое исследование позволило установить, что штамм *mel Ras* является беспигментной меланомой преимущественно альвеолярно-дольчатого строения с участками солидного типа.

Чувствительность п/к ксенографтов с мутацией *NRAS* установлена при проведении лечения специ-

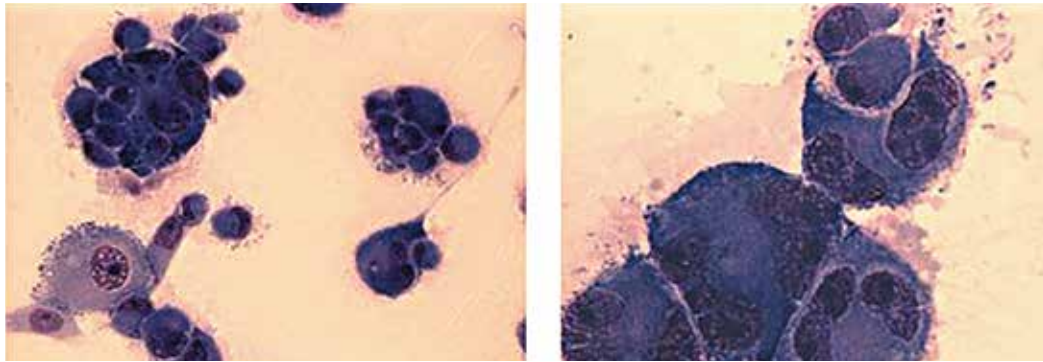


Рис. 3. Цитологическая картина клеточного состава линии клеток беспигментной меланомы кожи человека *mel Ras* (слева $\times 40$, справа $\times 100$)

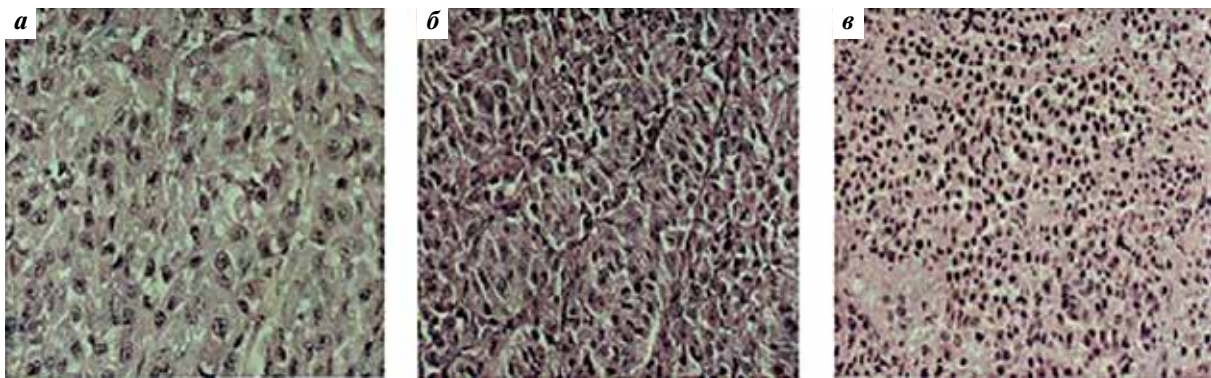


Рис. 4. Гистологическая картина подкожного ксенографта меланомы кожи человека *mel Ras* 9-го пассажа на 19-е сутки роста: а – опухолевые клетки крупные, полиморфные, цитоплазма темная, местами светлая. Клетки образуют солидные скопления. Видно несколько клеток с признаками митоза. $\times 400$; б – опухолевые клетки образуют тяжи, разделенные тонкими соединительно-тканными прослойками. Клетки крупные, местами веретенообразные. Единичные клетки с признаками митоза. $\times 400$; в – опухолевые клетки полиморфные, ядра гиперхромные. Клетки образуют солидные скопления, местами ячейки. $\times 100$

фическим ингибитором *NRAS* траметинибом мышей с п/к ксенографтами 9-го пассажа. Получена полная ремиссия опухоли у всех мышей в течение 11 сут после лечения до гибели мышей с опухолью в группе контроля (рис. 5).

Выводы

- Клеточная линия беспигментной меланомы кожи человека *mel Ras* с проспективно определенной мутацией *NRAS* адаптирована к росту у иммунодефицитных мышей-самок Valb/c

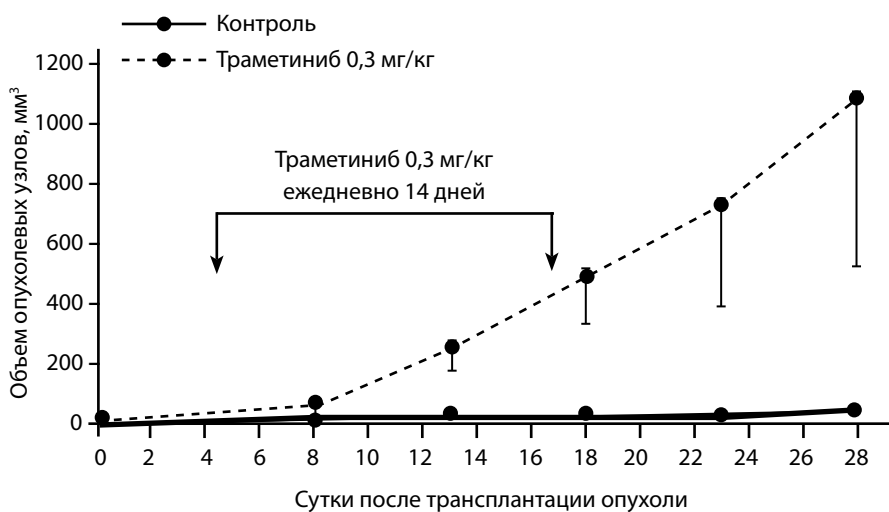


Рис. 5. Полная ремиссия подкожных ксенографтов беспигментной меланомы кожи человека *mel Ras* с мутацией *NRAS* 9-го пассажа под действием 14-суточного курса лечения траметинибом в дозе 0,3 мг/кг

- nude в виде п/к ксенографтов идентичного клеточного состава.
- 100 % прививаемость достигается имплантацией 1×10^7 клеток mel Ras (нулевой пассаж).
 - Трансплантации 50 мг взвеси опухолевой ткани приводит к устойчивой прививаемости п/к ксенографтов до 9 пассажей *in vivo*.
 - Начиная с 4-го пассажа п/к ксенографтов mel Ras кинетика роста стабильна: латентная фаза — до 8 сут, экспоненциальная фаза — до 14 сут и стационарная фаза — до 19 сут с достижением $V_{cp} = 1353,7 \pm 543,0$ мм³.
 - Стабильно растущие п/к ксенографты mel Ras высокочувствительны к таргетной терапии ингибитором *NRAS* траметинибом.

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

1. Демидов Л.В., Орлова К.В. Индивидуализация лекарственного лечения меланомы кожи. Практическая онкология 2013;14(4):239–46.
2. Albino A., LeStrange R. Transforming Ras genes from human melanoma: a manifestation of tumor heterogeneity? Nature 1984;308(5954):69–72. PMID: 6700714.
3. Colombino M., Capone M., Lissia A. et al. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. J Clin Oncol 2012;30(20):2522–9. DOI: 10.1200/JCO.2011.41.2452. PMID: 22614978.
4. Jakob J.A., Bassett R.L. Jr., Ng C.S. et al. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. Cancer 2012;118(16):4014–23. DOI: 10.1002/cncr.26724. PMID: 22180178.
5. Ascierto P.A., Schadendorf D., Berking C. et al. MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. Lancet Oncol 2013;14(3):249–56. DOI: 10.1016/S1470–2045(13)70024-X. PMID: 23414587.
6. Gottardo F., Liu C.G., Ferracin M. et al. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. Urol Oncol 2007;25(5):387–92. doi: 10.1016/j.urolonc.2007.01.019. PMID: 17826655.
7. Jaiswal B.S., Janakiraman V., Kljavin N.M. et al. Combined targeting of BRAF and CRAF or BRAF and PI3K effector pathways is required for efficacy in NRAS mutant tumors. PLoS One 2009;4(5):e5717. DOI: 10.1371/journal.pone.0005717. PMID: 19492075.
8. Posch C., Moslehi H., Feeney L. et al. Combined targeting of MEK and PI3K/mTOR effector pathways is necessary to effectively inhibit NRAS mutant melanoma *in vitro* and *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 2013;110(10):4015–20. DOI: 10.1073/pnas.1216013110. PMID: 23431193.
9. Inma S. Dabrafenib/Trametinib combination approved for advanced melanoma. Published Online: Thursday, January 9, 2014. <http://www.onclive.com/web-exclusives/FDA-Approves-First-Ever-Combination-for-Metastatic-Melanoma>.
10. Патент РФ № 2402602, 2009. Клеточная линия меланомы человека mel Ras, используемая для получения противоопухолевых вакцин. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Демидов Л.В. и др. URL: <http://www.freepatent.ru/patents/2402602>.
11. Трещалина Е.М. Коллекция опухолевых штаммов человека. Под ред. М.И. Давыдова. М., 2009. С. 37–38.
12. Патент РФ № 2364624, 2008. Клеточная линия меланомы человека mel Ceg, используемая для получения противоопухолевых вакцин. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Демидов Л.В. и др. URL: <http://www.freepatent.ru/patents/2364624>.
13. Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши разведения ГУ РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Возможности использования. М., 2010. С. 26.

ОЦЕНКА ПОБОЧНЫХ ЭФФЕКТОВ БИОМОДИФИЦИРОВАННОЙ L-АСПАРАГИНАЗЫ WAS79 В ХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КРОЛИКАХ

Э.Р. Переверзева¹, И.Д. Трещалин¹, М.И. Трещалин¹, Е.В. Возняковская¹, Т.Б. Переверзева¹,
Н.В. Еремкин¹, Н.В. Булушова², Е.П. Санникова²

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»; Россия, 119021,
Москва, ул. Б. Пироговская, 11, стр. 1;

²ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»;
Россия, 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, 1

Контакты: Элеонора Рафаиловна Переверзева pereverzeva-ella@yandex.ru

Цель исследования – изучение токсических свойств лекарственной формы биомодифицированной L-аспарагиназы Was79 в хроническом эксперименте на кроликах.

Материалы и методы. На самцах и самках кроликов породы «Советская шиншилла» проведено изучение хронической токсичности L-аспарагиназы Was79, производной природного фермента *Wolinella succinogenes*, полученной во ФГУП «ГосНИИ-генетика». Препарат вводили внутривенно в 1 и 5 терапевтических дозах (100 и 500 МЕ/кг ежедневно в течение 15 сут). Параметры исследования: масса тела, клинический и биохимический анализ крови, клинический анализ мочи, электрокардиография, патоморфологическое исследование внутренних органов.

Результаты. Показано, что применение Was79 не оказывает влияния на функцию сердца и почек, но повреждает их структуру. Гастроинтестинальная токсичность проявляется в виде снижения массы тела животных, диареи, изменений слизистой оболочки желудка и кишечника. Гематотоксичность выражается в снижении общего количества лейкоцитов, лимфоцитов и гранулоцитов в периферической крови и атрофии лимфоидной ткани в селезенке, тимусе и лимфатических узлах. Увеличение уровня прямого и общего билирубина и патологические изменения в печени были отмечены в группах животных, получавших как высокую, так и низкую дозу Was79.

Выводы. Обнаруженные изменения обратимы и зависят от дозы препарата.

Ключевые слова: L-аспарагиназа, *Wolinella succinogenes*, хроническая токсичность, кролики

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-47-54

EVALUATION OF BIOMODIFIED L-ASPARAGINASE WAS79 SIDE EFFECTS IN CHRONIC EXPERIMENT ON RABBITS

E.R. Pereverzeva¹, I.D. Treschalin¹, M.I. Treschalin¹, E.V. Voznyakovskaya¹, T.B. Pereverzeva¹,
N.V. Eremkin¹, N.V. Bulushova², E.P. Sannikova²

¹Gause Institute of new antibiotics; p. 1, 11, B. Pirogovskaya str., Moscow, 119021, Russia;

²Research Institute of Genetics and Selection; 1, 1st Dorozhny proezd, Moscow, 117545, Russia

Objective. The aim of the study was to research the toxicity of L-asparaginase Was79 in rabbits.

Materials and methods. Chronic toxicity of L-asparaginase Was79, obtained by modification of native enzyme *Wolinella succinogenes* in Research Institute of Genetics and Selection, was performed in male and female Russian chinchilla rabbits. L-asparaginase was injected intravenously at the 1 and 5 therapeutic dose (15 × 100 IU/kg or 15 × 500 IU/kg with 24-h interval). The following parameters were tested: body mass, clinical and biochemical blood tests, urinalysis, electrocardiography, pathomorphological evaluation of internal organs.

Results. The results of the study suggest that the treatment with L-asparaginase Was79 does not influence on the function of heart and kidneys, but damages their structure. Loss in body mass, diarrhea and alteration of stomach and intestine mucosa could be interpreted as evidence of gastrointestinal toxicity. Hematological toxicity was exhibited as a decrease of total leukocyte count, lymphocyte and neutrophils count level in peripheral blood and atrophy of lymphoid tissue of the spleen, thymus and lymph nodes. Elevation of total and direct bilirubin in serum and histopathological findings in liver were found in groups treated with both high and low doses of Was79.

Conclusion. Most of these abnormalities were reversible and dose-dependent.

Key words: L-asparaginase, *Wolinella succinogenes*, chronic toxicity, rabbits

Введение

Токсичность L-аспарагиназ связывают с их глутаминазной активностью [1–5]. Во многих исследованиях было показано, что уменьшение содержания глутаминазы в препарате приводит к ослаблению его гепато- и панкреатоксичности, иммуносупрессивного действия, но сопровождается снижением противоопухолевого эффекта [6–9].

Во ФГУП «ГосНИИгенетика» был сконструирован химерный вариант Was79, модифицированной L-аспарагиназы *Wolinella succinogenes*, генетически слитой с гепаринсвязывающим пептидом одного из белков человека, с пониженным уровнем глутаминазной активности.

Преимущества Was79: высокая противоопухолевая эффективность, устойчивость к протеолизу под действием трипсина, продолжительная циркуляция в кровотоке [10, 11].

Цель исследования – изучение токсических свойств лекарственной формы биомодифицированной L-аспарагиназы Was79 в хроническом эксперименте на кроликах.

Материалы и методы

Работа выполнена в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [12]. Исследования проведены на половозрелых кроликах породы «Советская шиншилла», самцах и самках массой 2200–2700 г, полученных из центрального питомника «Белый Мох». После 2-недельного карантина животные были разделены на 6 групп по 6 особей в каждой. Was79 вводили в краевую вену уха в течение 15 сут в разовых дозах 100 и 500 МЕ/кг, эквивалентных 1 и 5 терапевтическим дозам соответственно. Величина терапевтической дозы для кролика была рассчитана путем пересчета лечебной дозы для мышей, определенной экспериментально [13]. Контролем служили интактные животные обоих полов.

Оценку токсического действия препарата осуществляли в соответствии с методическими рекомендациями по изучению общетоксического действия лекарственных средств [14]. В ходе эксперимента проводили визуальный, инструментальный и лабораторный контроль состояния животных. Массу тела животных определяли 1 раз в неделю при помощи весов «Сартогосм» (Россия). Клинический анализ крови (лейкоциты, эритроциты, гемоглобин, тромбоциты, лейкоформула и гематокрит) производили на 0, 7-е и 15-е сутки во время курса и на 1, 3, 5, 7, 10 и 15-е сутки по окончании курса введений Was79 (Abacus Junior Vet, Швейцария). На 1-е и 15-е сутки по окончании курса введений препарата в сыворотке

крови определяли аланиновую (АЛТ) и аспарагиновую аминотрансферазу (АСТ), щелочную фосфатазу (ЩФ), креатинин, мочевины, билирубин (прямой и общий), общий белок, альбумин, глюкозу (ChemWell, США). На 1-й и 15-й дни по окончании курса введений регистрировали электрокардиограмму (ЭКГ) во 2-м стандартном отведении («ЭК1Т-07», Россия), проводили клинический анализ мочи (Laura Smart Lachema, Чехия).

На 1-е и 15-е сутки по окончании курса введений препарата половину животных из каждой группы подвергали эвтаназии. Сердце, печень, почки, тимус и селезенку взвешивали и определяли их массовые коэффициенты. Участки внутренних органов фиксировали в 10 % нейтральном формалине, по стандартной методике заливали в парафин, срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Полученные количественные данные подвергали статистической обработке при помощи компьютерной программы StatPlus 2006 с использованием критерия *t* Фишера – Стьюдента. Различия определяли как достоверные при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В настоящее время в терапии определенных видов лейкозов используют 3 типа L-аспарагиназ: эльспар (ЕсА), онкаспар (пэгаспаргаза, РЕсА) и эрвиназа (ЕгА). ЕсА (нативный фермент) и его рекомбинантное пегилированное производное РЕсА получены из *Escherichia coli*, ЕгА – из *Erwinia chrysanthemi*. Клиническое изучение L-аспарагиназ, продолжавшееся более 40 лет, показало, что применение как ЕсА, так и ЕгА, сопровождают реакции гиперчувствительности, выраженная иммуносупрессия, коагулопатии, поражения печени и поджелудочной железы [15]. Пегилирование аспарагиназы позволяет несколько уменьшить интенсивность иммунного ответа [16]. По выраженности и частоте развития других побочных эффектов у пациентов эти препараты существенно не различаются [3, 17].

Экспериментальные исследования L-аспарагиназ, проведенные на различных видах животных, показали, что кролики наиболее чувствительны к токсическому действию этих лекарственных средств [15, 18, 19], поэтому особый интерес представляет изучение побочных эффектов лекарственной формы Was79 на кроликах.

Проведенное исследование показало, что животные хорошо переносят препарат. В течение эксперимента ни в одной из групп не было отмечено гибели животных, отклонений в поведенческих реакциях, изменений состояния кожи и волосяного покрова. У части животных, получавших препарат в высокой дозе, сразу после окончания курса введений возник ринит. У 1 животного выявлен конъюнктивит.

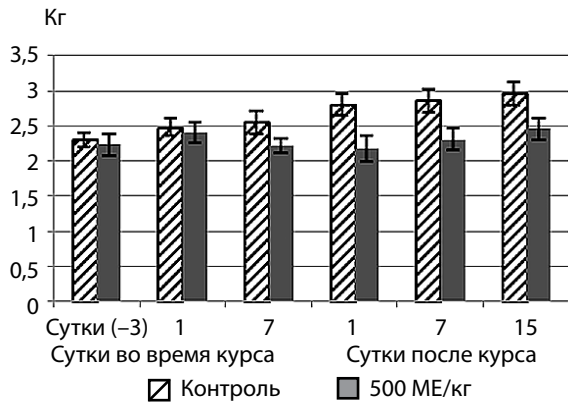


Рис. 1. Динамика массы тела самцов после курса введений *L*-аспарагиназы Was79

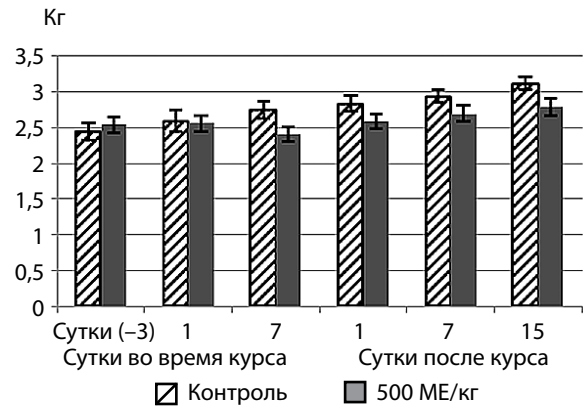


Рис. 2. Динамика массы тела самок после курса введений *L*-аспарагиназы Was79

Риниты и конъюнктивиты при клиническом применении *L*-аспарагиназа отмечают довольно редко, в основном их ассоциируют с гиперчувствительностью к препарату [19, 20].

У некоторых животных, получавших Was79 в разовой дозе 500 МЕ/кг, к середине курса введений развилась диарея, которая сохранялась до 3–5 сут после окончания курса. После 7 введений у этих животных было отмечено достоверное уменьшение массы тела, которое сохранялось до окончания срока наблюдения (рис. 1, 2).

Диарея и снижение массы тела – распространенные побочные эффекты при клиническом применении аспарагиназа [20], которые были обнаружены и в экспериментах на кроликах при изучении ЕсА и ЕгА [15, 19, 21].

При патоморфологическом исследовании животных, получавших Was79 в высокой дозе, на 1-е сут после курса введений препарата в желудке 3 самцов и 2 самок были найдены очаги деструкции или атрофии покровно-ямочного эпителия, полнокровие его капилляров (рис. 3а, б). Такие же изменения были выявлены у 1 самца и 2 самок и на 15-е сут после курса. У остальных животных структура слизистой оболочки желудка не отличалась от контроля. Повреждающее действие Was79 на структуру слизистой оболочки тонкой кишки проявлялось только при использовании препарата в высокой дозе и выражалось в виде полнокровия капилляров и деструкции апикальной зоны ворсинок (рис. 3в, г). К концу наблюдения она полностью восстанавливалась.

При исследовании гематотоксических свойств Was79 изменений количества эритроцитов, тромбоцитов, содержания гемоглобина, величины гематокрита не выявлено. Однако во всех группах подопытных животных к концу курса введений было зарегистрировано уменьшение общего количества лейкоцитов, которое при этом не выходило за пределы физиологической нормы.

У самцов снижение числа лейкоцитов происходило за счет уменьшения количества лимфоцитов, у самок – как за счет лимфоцитов, так и за счет гранулоцитов. Снижение количества лимфоцитов у самок возникало только при применении препарата в высокой дозе (рис. 4–9).

При анализе массива данных о побочных эффектах *L*-аспарагиназа в клинической практике установлено, что изменения общего количества лейкоцитов возникают у 3,8 % больных. У части пациентов количество лейкоцитов уменьшается за счет лимфоидных элементов, у 2,3 % лейкоцитопения проявляется в виде нейтропении [17, 22].

Данные гематологического исследования коррелировали с результатами патоморфологического изучения структуры селезенки, тимуса и лимфатических узлов (ЛУ). На 1-е сутки после курса введений Was79 в разовой

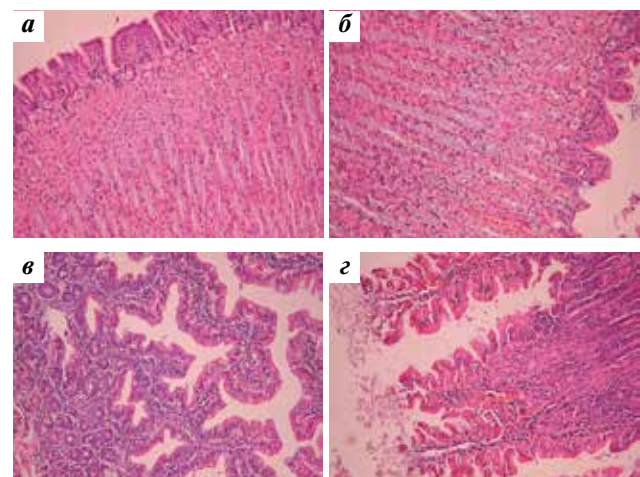


Рис. 3. Структура слизистой оболочки желудка и тонкой кишки до и после курса введений *L*-аспарагиназы Was79: а – желудок, интактный контроль. $\times 20$; б – желудок, Was79 500 МЕ/кг. $\times 15$. Полнокровие капилляров, очаги деструкции или атрофии покровно-ямочного эпителия. $\times 20$; в – тонкая кишка, интактный контроль, $\times 20$; г – тонкая кишка, Was79 500 МЕ/кг. $\times 15$. Полнокровие капилляров, деструкция апикальной зоны ворсинок. $\times 20$

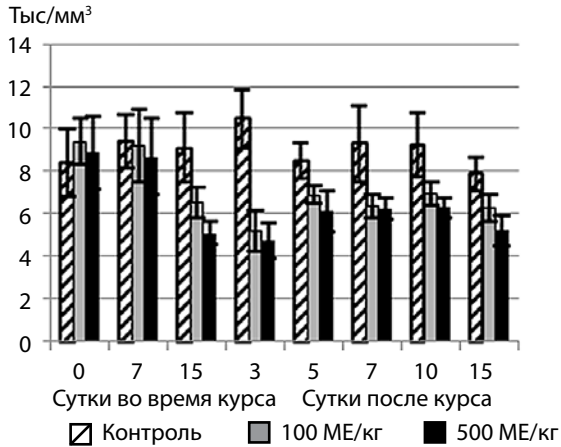


Рис. 4. Общее количество лейкоцитов у самцов кроликов

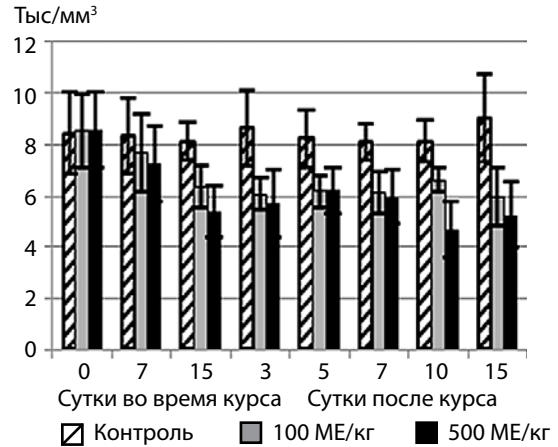


Рис. 5. Общее количество лейкоцитов у самок кроликов

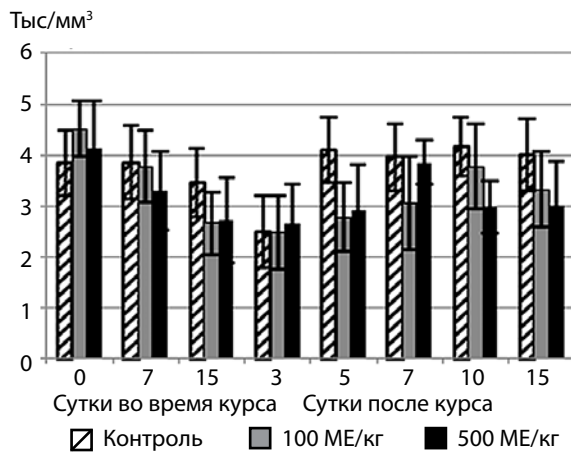


Рис. 6. Абсолютное количество гранулоцитов у самцов кроликов

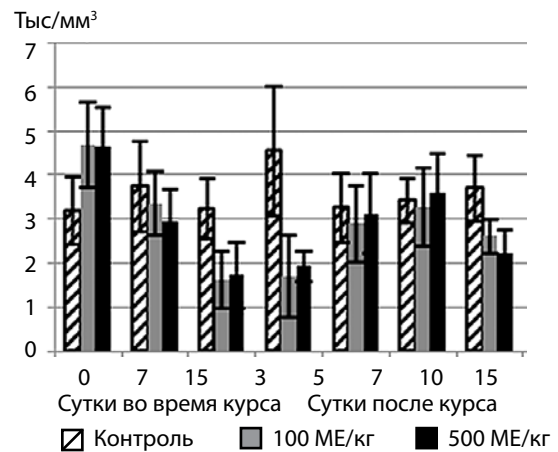


Рис. 7. Абсолютное количество гранулоцитов у самок кроликов

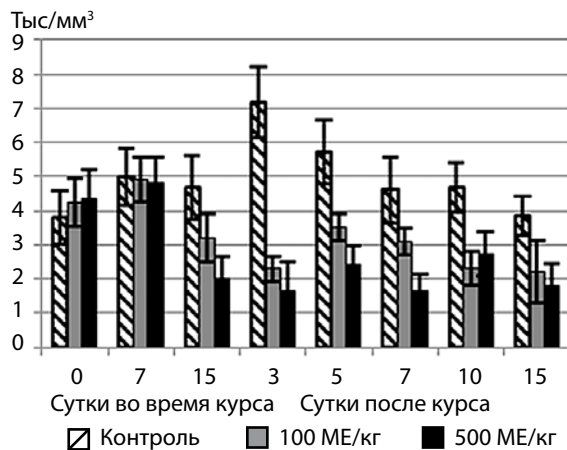


Рис. 8. Абсолютное количество лимфоцитов у самцов кроликов

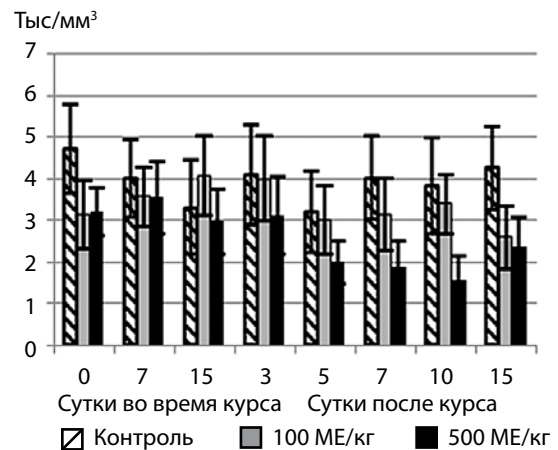


Рис. 9. Абсолютное количество лимфоцитов у самок кроликов

дозе 500 МЕ/кг были отмечены глубокая атрофия лимфоидной ткани фолликулов в селезенке (рис. 10а, б), резкое полнокровие красной пульпы, а у некоторых животных – и кровоизлияния (рис. 10в). У животных, получавших Was79 в терапевтической дозе, эти изме-

нения были менее выражены. К концу эксперимента структура органа не отличалась от контроля.

Несмотря на глубокие атрофические изменения в лимфоидной ткани селезенки, ее массовый коэффициент не уменьшался, что, по-видимому, связано

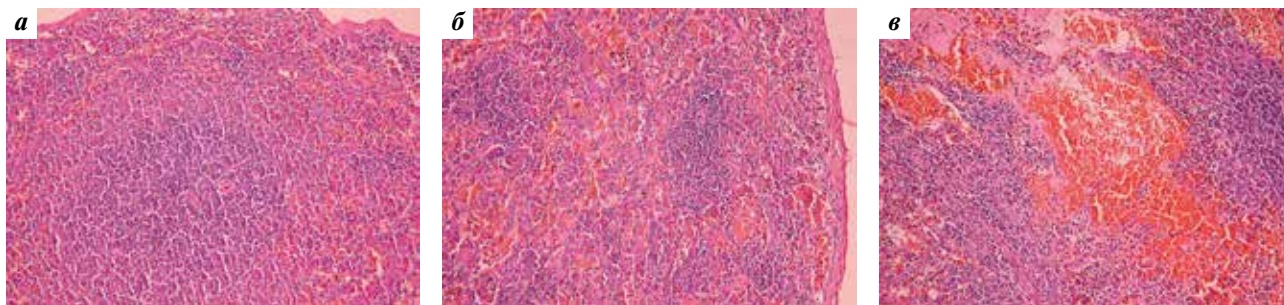


Рис. 10. Структура селезенки до и после курса введений L-аспарагиназы Was79: а – интактный контроль. $\times 20$; б – Was79 500 ME/кг. $\times 15$. Глубокая атрофия лимфоидной ткани фолликулов. Резкое полнокровие красной пульпы. $\times 20$; в – Was79 500 ME/кг. $\times 15$. Кровоизлияния в красной пульпе. $\times 20$

с полнокровием органа. Отек и полнокровие в селезенке были отмечены и в других исследованиях, проведенных на кроликах [23], в которых также наблюдали некроз герминативных центров в селезенке и ЛУ [19, 23].

В нашем эксперименте введение Was79 в разовой дозе 500 ME/кг приводило на 1-е сутки после курса к глубокой атрофии лимфоидной ткани фолликулов в ЛУ и в корковой и мозговой зоне тимуса, что подтверждалось снижением массового коэффициента тимуса. Использование терапевтической дозы препарата не оказывало повреждающего действия на структуру тимуса и ЛУ.

Глубокие атрофические изменения лимфоидной ткани селезенки, ЛУ и тимуса – выраженные признаки иммуносупрессивного действия исследуемого препарата. Хотя они проявлялись только при применении высокой дозы Was79, можно ожидать проявления иммуносупрессии и в клинике.

Признаки гепатотоксического действия препарата в виде повышения содержания прямого и общего билирубина в сыворотке крови были выявлены на 1-е сутки после окончания введений Was79. Через 15 сут эти показатели не отличались от контроля (рис. 11–14).

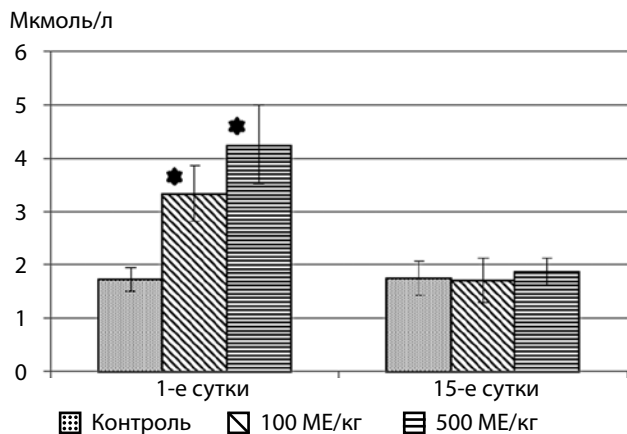


Рис. 11. Общий билирубин (самцы кроликов). Здесь и на рис. 12–14: * отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$

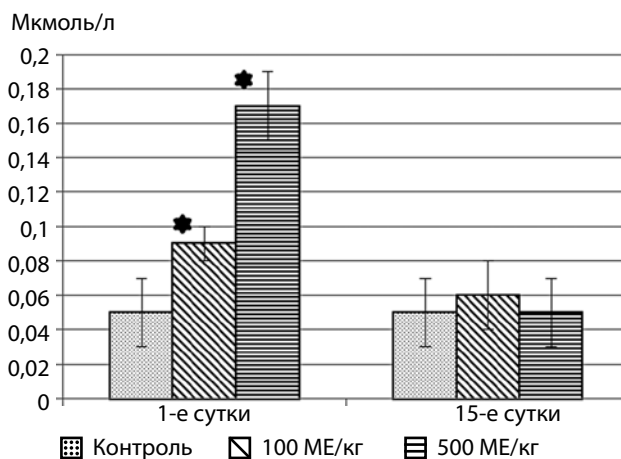


Рис. 12. Прямой билирубин (самцы кроликов)

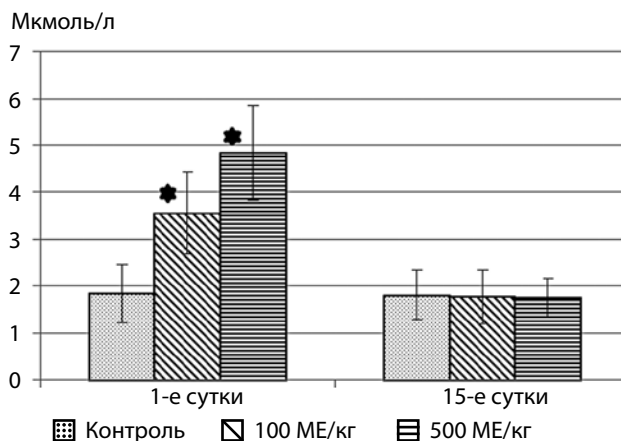


Рис. 13. Общий билирубин (самцы кроликов)

При патоморфологическом изучении структуры печени животных, получавших препарат в высокой дозе как на 1-е, так и на 15-е сутки после курса введений были обнаружены очаги микронекроза вблизи триад и центральных вен (рис. 15а, б). На 15-е сутки у 1 самца и 1 самки вокруг отдельных триад было выявлено повышенное развитие соединительной ткани и найдены небольшие группы гепатоцитов в состоянии вакуольной дистрофии (рис. 15в, г). При применении Was79 в дозе 100 ME/кг эти явления были

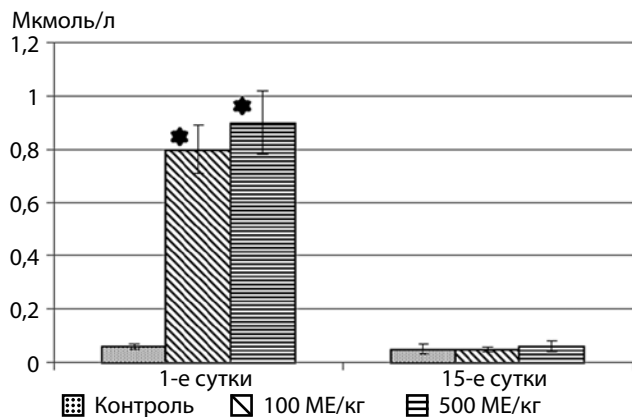


Рис. 14. Прямой билирубин (самки кроликов)

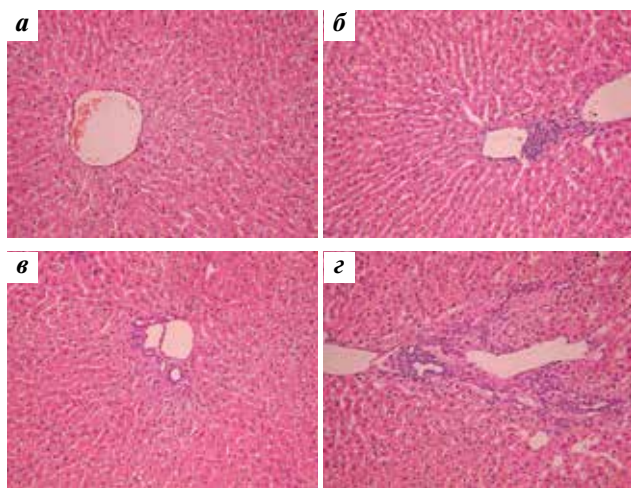


Рис. 15. Структура печени до и после курса введений *L*-аспарагиназы *Was79*: а – интактный контроль. Центральная вена. $\times 20$; б – *Was79* 500 ME/kg. $\times 15$. Некроз гепатоцитов вблизи центральной вены. $\times 20$; в – интактный контроль. Триада. $\times 20$; г – *Was79* 500 ME/kg. $\times 15$. Умеренный отек, микронекроз, повышенное развитие соединительной ткани вокруг триады, небольшая группа гепатоцитов в состоянии вакуольной дистрофии. $\times 20$

выражены слабее и отмечались лишь у отдельных животных сразу после курса.

Гепатотоксичность – один из распространенных видов токсичности *L*-аспарагиназа. В доклинических исследованиях *EsA* и *EtA* ее проявления в виде вакуолизации гепатоцитов, повышения уровня трансаминаз, жировой дистрофии печени были отмечены у кроликов и обезьян, причем у животных, получавших *EtA*, они были менее выраженными [15]. У пациентов нарушения функции печени включают повышение АЛТ, АСТ, ЩФ, билирубина (прямого и общего), сывороточного альбумина, фибриногена плазмы крови. При исследовании биоптатов печени обнаруживается жировая дистрофия гепатоцитов [19, 24–26].

При исследовании состава мочи на 1-е и 15-е сутки после окончания курса введений *Was79* различий между подопытными и контрольными группами не выявлено. Однако при патоморфологическом

изучении структуры почек на 1-е сутки после курса введений препарата в разовой дозе 500 ME/kg наряду с полнокровием капилляров интерстиция и сильным периваскулярным отеком в корковой и юкстамедуллярной зонах были обнаружены множественные мелкие очаги деструкции извитых канальцев (рис. 16а, б). В клубочках юкстамедуллярной зоны отмечена резкая вакуолизация эндотелия капилляров, очаговая деструкция капиллярной сети (рис. 16в). У 2 самок к концу наблюдения во всех зонах почки были выявлены множественные обширные очаги некроза канальцев, которые подвергались организации с формированием кист, содержащих аморфные белковые массы (рис. 16г). Применение *Was79* в низкой дозе приводило к умеренному периваскулярному отеку, возникновению единичных мелких очагов деструкции извитых канальцев.

При клиническом применении *L*-аспарагиназа патология почек выявлена только при передозировках препарата [17]. Единичные случаи острой почечной недостаточности были отмечены у больных, получавших *EsA* [27].

По результатам ЭКГ-признаков кардиотоксического действия *Was79* не обнаружено. Ее использование в терапевтической дозе не оказывало влияния на структуру миокарда животных. При введении препарата в высокой дозе у 1 самца и 1 самки на 1-е сутки и у 1 самца на 15-е сутки после курса были найдены крупные очаги токсической кардиомиопатии, отека и вакуолизации мышечных волокон.

Нарушения структуры и функции сердца, которые выявляются при лечении больных, вторичны

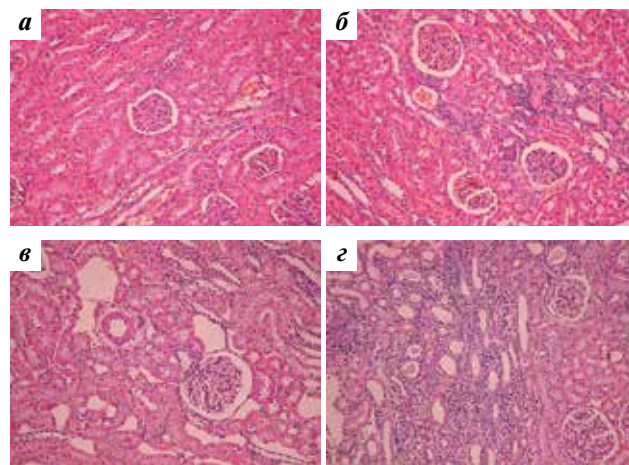


Рис. 16. Структура почки до и после курса введений *L*-аспарагиназы *Was79*: а – интактный контроль. Юкстамедуллярная зона. $\times 20$; б – *Was79* 500 ME/kg. $\times 15$. Очаг некроза и вакуольной дистрофии извитых канальцев в юкстамедуллярной зоне. $\times 20$; в – *Was79* 500 ME/kg. $\times 15$. Резкая вакуолизация эндотелия капилляров клубочка, очаговая деструкция капиллярной сети. $\times 20$; г – *Was79* 500 ME/kg. $\times 15$. Юкстамедуллярная зона. Обширный очаг некроза извитых канальцев в стадии организации. Кисты, содержащие аморфные белковые массы. $\times 20$

по отношению к другим побочным эффектам L-аспарагиназа [19] и в значительной степени связаны с тромбозами [28], однако у некоторых пациентов, получавших высокие и низкие дозы EгА, было отмечено удлинение интервала QT [22].

Реализация повреждающего действия Was79 на органы и ткани в значительной мере зависела от индивидуальной чувствительности организма животных. Так, при изучении структуры легкого кроликов, получавших препарат в высокой дозе, у 1 самца на 1-е сутки после курса введений было отмечено резкое полнокровие капилляров альвеолярных перегородок (рис. 17а, б). На 15-е сутки после курса у 1 самки были найдены кровоизлияния (рис. 17в), у другой – единичные небольшие очаги фиброза (рис. 17г).

При исследовании поджелудочной железы у 2 самцов и 2 самок на 1-е сутки после курса введений препарата в высокой дозе выявлены кровоизлияния и очаговая деструкция клеток в островках Лангерганса, а также множественные очаги некроза разных размеров в экзокринной части железы.

На эти изменения следует обратить внимание, так как они показывают, что при определенных условиях к органам-мишеням Was79 могут относиться легкие и поджелудочная железа. Панкреатоксическое действие L-аспарагиназа известно [29], в клинике оно проявляется в виде гипергликемии и панкреатитов [17, 22].

Кровоизлияния, найденные в различных органах кроликов, указывают на возможность развития геморрагических процессов и у людей [30]. При клиническом применении L-аспарагиназа кровоизлияния регистрируют у 1–2 % пациентов [22].

Заключение

Изучение хронической токсичности Was79 на кроликах показало, что этот вид животных действительно более чувствителен к L-аспарагиназу. На кроликах удалось выявить виды токсичности, которые не были установлены в хроническом эксперименте на крысах [31], – ринит, конъюнктивит, диарею, снижение массы тела, изменения показателей периферической крови. Признаки гастроинтестинальной и гематологической токсичности у крыс были найдены только при патоморфологическом исследовании. У кроликов они

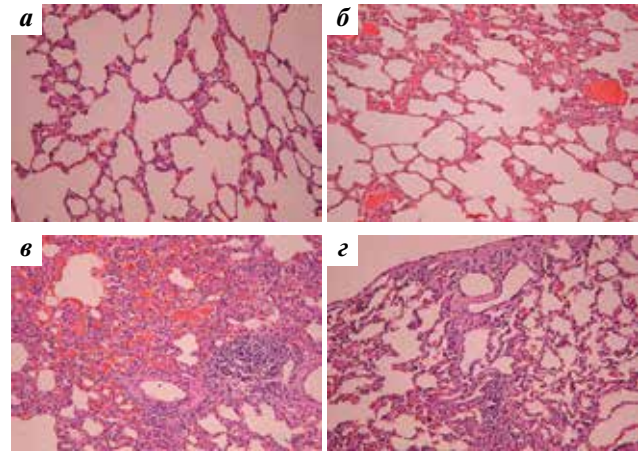


Рис. 17. Структура легкого до и после курса введений L-аспарагиназы Was79: а – интактный контроль. $\times 20$; б – Was79 500 ME/kg. $\times 15$. Резкое полнокровие капилляров альвеолярных перегородок. $\times 20$; в – Was79 500 ME/kg. $\times 15$. Кровоизлияния, лимфогистиоцитарный инфильтрат в сосудистом пучке. $\times 20$; г – Was79 500 ME/kg. $\times 15$. Небольшие очаги фиброза в ткани легкого. $\times 20$

проявились клинически. О гепатотоксическом действии препарата у кроликов свидетельствовало повышение уровня прямого и общего билирубина в сыворотке крови, тогда как у крыс повышалась активность АЛТ и ЩФ. Так же как у крыс, препарат не оказывал влияния на функции почек и сердца, но при патоморфологическом исследовании были обнаружены повреждения тканей этих органов, которые у кроликов полностью не репарировались. Тем не менее и у кроликов удалось проследить зависимость изменений структуры внутренних органов от величины примененной дозы, что позволяет рекомендовать Was79 для дальнейшего изучения.

Результаты изучения хронической токсичности Was79 на кроликах указывают на то, что этот препарат при клиническом применении может проявить такое же побочное действие, как и L-аспарагиназы предыдущих поколений. Органы и системы, являющиеся мишенями L-аспарагиназа, в данном случае остаются теми же. Этот факт заставляет усомниться в прямой зависимости токсического действия L-аспарагиназа от их глутаминазной активности и наводит на мысль о существовании других факторов, влияющих на переносимость лечения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Chan W.K., Lorenzi Ph. L., Anishkin A. et al. The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. *Blood* 2014;123(23):3596–606. DOI: 10.1182/blood-2013-10-535112. PMID: 24659632.

2. Covinia D., Tarditob S., Bussolatib O. et al. Expanding targets for a metabolic therapy of cancer: L-asparaginase. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2012;7(1): 4–13. PMID: 21854356.

3. Duval M., Suciuc S., Ferster A. et al. Comparison of *Escherichia coli* asparaginase

with *Erwinia* asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood* 2002;99(8):2734–9. PMID: 11929760.

4. Ollenschläger G., Roth E., Linkesch W. et al. Asparaginase-induced derangements of glutamine metabolism: the pathogenetic basis for some drug-related side-effects. *Eur J Clin Invest* 1988;18(5):512–6. PMID: 3147904.
5. Reinert R.B., Oberle L.M., Wek S.A. et al. Role of glutamine depletion in directing tissue-specific nutrient stress responses to L-asparaginase. *J Biol Chem* 2006;281(42):31222–33. DOI: 10.1074/jbc.M604511200. PMID: 16931516.
6. Bendich A., Kafkewitz D., Abuchowski A., Davis F.F. Immunological effects of native and polyethylene glycol-modified asparaginases from *Vibrio succinogenes* and *Escherichia coli* in normal and tumour-bearing mice. *Clin Exp Immunol* 1982;48(1):273–8. PMID: 7044632.
7. Distasio J.A., Salazar A.M., Nadji M., Durden D.L. Glutaminase-free asparaginase from *Vibrio succinogenes*: an antilymphoma enzyme lacking hepatotoxicity. *Int J Cancer* 1982;30(3):343–7.
8. Durden D.L., Distasio J.A. Comparison of the immunosuppressive effects of asparaginases from *Escherichia coli* and *Vibrio succinogenes*. *Cancer Res* 1980;40(4):1125–9. PMID: 6986981.
9. Villa P., Corada M., Bartosek I. L-asparaginase effects on inhibition of protein synthesis and lowering of the glutamine content in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Lett* 1986;32(3):235–41. PMID: 3535170.
10. Покровский В.С. Новые подходы к созданию и экспериментальному изучению препаратов на основе противоопухолевых ферментов. Дис.... д-ра. мед. наук. М., 2015.
11. Покровский В.С., Залунин И.А., Константинова Г.Е. и др. Гибридный белок на основе L-аспарагиназы *Wolinella succinogenes*, штамм *Escherichia coli* – продуцент гибридного белка (варианты) и способ получения гибридного белка, обладающего противоопухолевой активностью. Патент РФ № 2562166 от 09.10.2014.
12. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Council of Europe, ETS No. 123). 1986.
13. Freireich E.J., Gehan E.A., Rall D.P. et al. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother Rep* 1966;50(4):219–44. PMID: 4957125.
14. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. М., 2012. С. 13–24.
15. FDA. Erwinaze. Pharmacology review. Application № 125359. Approval date: 10/27/2011. URL: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/125359Orig1s000PharmR.pdf
16. Avramis V.I., Tiwari P.N. Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Int J Nanomed* 2006;1(3):241–54. PMID: 17717965.
17. FDA. Erwinaze. Clinical review. Application № 125359. Approval date: 11/18/2011. URL: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/125359Orig1s000MedR.pdf
18. Medicines evaluation board. Public assessment report. Erwinase, powder for solution for injection 10,000 IU/vial. Procedure number L/H/3194/001/MR. September 2015, p. 1–17(5–6). URL: <http://db.cbg-meb.nl/Pars/h16986.pdf>
19. Product Information. Elspar (asparaginase). Merck & Co, Inc., West Point, PA.
20. Health Products Regulatory Authority. CRN 2126255. Erwinase 10,000 units powder for solution for injection. Date printed 10/07/2014. URL: http://www.hpra.ie/img/uploaded/swedocuments/License_SPC_PA1020-002-001_10072014123107.pdf
21. Lavine R.L., Dicintio D.M. L-Asparaginase-induced diabetes mellitus in rabbits. *Diabetes* 1980;29(7):528–31. PMID: 6991339.
22. Plourde P.V., Jeha S., Hijiya N. et al. Safety profile of asparaginase *Erwinia chrysanthemi* in a large compassionate-use trial. *Pediatr Blood Cancer* 2014;61(7):1232–8. DOI: 10.1002/pbc.24938. PMID: 24436152.
23. Chisari F.V., Hochstein H.D., Kirschstein R.L., Seligmann E.B. Parathyroid necrosis and hypocalcemic tetany induced in rabbits by L-asparaginase. *Am J Pathol* 1972;68(3):461–8. PMID: 5054253.
24. Pratt C.B., Johnson W.W. Duration and severity of fatty metamorphosis of the liver following L-asparaginase therapy. *Cancer* 1971;28(2):361–4. PMID: 5109448.
25. Raetz E.A., Salzer W.L. Tolerability and efficacy of L-asparaginase therapy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2010;32(7):554–63. DOI: 10.1097/MPH.0b013e3181e6f003.
26. Storti E., Quaglini D. Dysmetabolic and neurologic complications in leukemic patients treated with L-asparaginase. *Recent Results Cancer Res* 1970;33:344–9. PMID: 5292723.
27. Haskel C.M., Canellos G.P., Leventhal B.G. et al. L-asparaginase: therapeutic and toxic effects in patients with neoplastic disease. *N Engl J Med* 1969;281(19):1028–34. DOI: 10.1056/NEJM196911062811902. PMID: 4898857.
28. Fragasso G., Pastore M.R., Vicari A. et al. Myocardial infarction in a patient with acute lymphoblastic leukemia during L-asparaginase therapy. *Am J Hematol* 1995;48(2):136–7. PMID: 7847336.
29. Keung Y.K., Rizk R., Wu X.Y., Cobos E. Drug-induced hypertriglyceridemia with and without pancreatitis. *South Med J* 1999;92(9):912–14. PMID: 10498170.
30. Priest J.R., Ramsay N.K.C., Steinhilber P.G. et al. A syndrome of thrombosis and hemorrhage complicating L-asparaginase therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr* 1982;100(6):984–9. PMID: 6953221.
31. Переверзева Э.П., Трещалин И.Д., Возняковская Е.В. и др. Токсикологическая характеристика биомодифицированного ферментного препарата – L-аспарагиназы Was79. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(4):53–8.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИФЕТРИЛИНА В ТАБЛЕТКАХ

З.С. Шпрах, Е.В. Игнатьева, И.В. Ярцева, Н.А. Дмитричева, Л.И. Смирнова

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Елена Владимировна Игнатьева chem_analysis@ronc.ru

Введение. В ряду аналогов гипоталамического гормона соматостатина, синтезированных в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, получен пентапептид – цифетрилин и создан лекарственный препарат цифетрилин, таблетки 6 мг. Одним из этапов стандартизации лекарственного средства является разработка методик количественного определения действующего вещества в готовом лекарственном препарате.

Цель исследования – разработка и валидация методики количественного определения содержания цифетрилина в лекарственном препарате цифетрилин, таблетки 6 мг.

Материалы и методы. В данной работе использованы цифетрилин, таблетки 6 мг, субстанция цифетрилина (филиал «Наукопрофи» ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»), вспомогательные вещества (лактозы моногидрат, микрокристаллическая целлюлоза, картофельный крахмал, повидон, тальк, стеарат магния), соответствующие требованиям Европейской фармакопеи действующего издания, спирт этиловый 95 %. Метод исследования – спектрофотометрия.

Результаты. Разработана методика спектрофотометрического количественного определения содержания цифетрилина в лекарственном препарате цифетрилин, таблетки 6 мг. С целью подтверждения достоверности и точности результатов проведена валидация аналитической методики. Методика оценена по валидационным характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность).

Выводы. Разработанная методика обеспечена специфичностью, правильностью, линейностью, сходимостью и внутрилабораторной прецизионностью и может применяться в диапазоне 70–130 % номинального значения содержания цифетрилина в препарате.

Ключевые слова: цифетрилин, количественное определение, спектрофотометрия, валидация

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-55-61

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF CYPHETRYLIN ASSAY IN TABLETS

Z.S. Shprakh, E.V. Ignatieva, I.V. Yartseva, N.A. Dmitricheva, L.I. Smirnova

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Background. In N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center have been synthesized a number of hypothalamic hormone somatostatin analogues, including pentapeptide cyphetrylin, and drug Cyphetrylin tablets 6 mg has been created. One of the drug standardization step is development of assay technique for acting substance in the final preparation.

Objective. Development and validation of cyphetrylin assay in tablets.

Materials and methods. The study used cyphetrylin, tablets 6 mg, cyphetrylin powder substance (FSBI “N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center”, branch “Naukaprofi”), lactose monohydrate, cellulose microcrystalline, potato starch, povidone, talc, magnesium stearate (European Pharmacopoeia current edition), 95 % ethyl alcohol. Method of assay – spectrophotometry.

Results. The technique for assay of cyphetrylin in drug “Cyphetrylin, tablets 6 mg” has been developed. Validation was performed to confirm test validity and accuracy. The technique was estimated by validation characteristics: specificity, linearity, accuracy, precision (repeatability and intermediate precision).

Conclusion. The developed technique has the required characteristics: specificity, accuracy, repeatability, intermediate precision, linearity and can be used in the range of 70–130 % of nominal cyphetrylin content in preparation.

Key words: cyphetrylin, assay, spectrophotometry, validation

Введение

Аналоги гипоталамического гормона соматостатина (октреотид, ланреотид, пасиреотид и др.)

занимают особое место в лечении больных с функционально активными нейроэндокринными опухолями. Как и природный соматостатин, его аналоги

подавляют выделение гормона роста, ингибируют секрецию глюкагона, инсулина, гастрина, секретина, холецистокинина, вазоактивного интестинального пептида, однако являются метаболически стабильными и, следовательно, обладают более выраженным и продолжительным терапевтическим действием [1, 2].

На протяжении ряда лет в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России проводились исследования по поиску потенциальных противоопухолевых соединений в ряду аналогов гипоталамических гормонов [3–5]. По результатам доклинических исследований для клинического изучения отобран защищенный по функциональным группам пентапептид – метиловый эфир N^α-трет-бутилоксикарбонил-S-тетрагидропиранил-L-цистеинил-L-фенилаланил-D-триптофил-N^ε-карбобензоксид-L-лизил-L-треонина – цифетрилин в лекарственной форме таблеток [3–7].

Один из этапов исследований по созданию лекарственного средства – разработка методик количественного определения содержания действующего вещества в готовом лекарственном препарате. При этом большое значение имеют методы анализа, позволяющие быстро и надежно выявить отклонения в качестве и свойствах препарата на самых ранних стадиях исследования. Простым и надежным методом контроля качества лекарственных средств признана спектрофотометрия в видимой и ультрафиолетовой (УФ) областях спектра. Применение этого метода отличается высокой достоверностью, воспроизводимостью и точностью и позволяет значительно упростить методики количественного анализа.

Валидация аналитической методики – это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения предлагаемых задач [8]. Валидация аналитической методики проводится как при внедрении новой методики на этапе разработки нового лекарственного препарата, так и при изменении условий анализа лекарственных средств.

Цель исследования – разработка и валидация методики количественного определения содержания цифетрилина в препарате цифетрилин, таблетки 6 мг, методом прямой спектрофотометрии. Валидацию разработанной методики проводили по следующим критериям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность) [8, 9].

Материалы и методы

Препараты и реактивы

Цифетрилин, таблетки 6 мг, субстанция цифетрилина (филиал «Наукопрофи» ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России), вспомогательные вещества (лактозы моногидрат, микрокри-

сталлическая целлюлоза, картофельный крахмал, повидон, тальк, стеарат магния), соответствующие требованиям Европейской фармакопеи действующего издания, спирт этиловый 95 %.

Приборы и аппаратура

Спектрофотометр Cary-100 (Varian, США), весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия).

Результаты и обсуждение

Для количественного определения содержания действующего вещества в таблетках цифетрилина применен метод спектрофотометрии. В УФ-спектре поглощения растворов субстанции цифетрилина в области длин волн от 200 до 350 нм наблюдаются максимумы при 274 ± 2 нм, 282 ± 2 нм и 290 ± 4 нм. Аналитическое значение имеет максимум при 282 ± 2 нм, так как удельный показатель поглощения при данной длине волны имеет наибольшее значение и растворитель в данной области спектра прозрачен (рис. 1).

Для оценки возможности применения метода исследована зависимость интенсивности поглощения цифетрилина от его концентрации в растворах. Линейный характер зависимости для растворов цифетрилина в диапазоне концентраций 0,02–0,20 мг/мл продемонстрирован на рис. 2.

При изучении спектральных характеристик растворов лекарственного препарата и вспомогательных веществ, входящих в его состав, показано, что вспомогательные вещества не влияют на положение максимумов полос поглощения действующего вещества, но имеют небольшое собственное поглощение в исследуемой области (рис. 3). В связи с этим в качестве раствора сравнения использовали раствор вспомогательных веществ. Для снижения систематических и случайных ошибок в методику анализа введен способ расчета по стандартному образцу (СО) – субстанции цифетрилина.

Методика

Для приготовления испытуемого раствора точную навеску растертых таблеток, соответствующую массе 1 таблетки, растворяли в 100 мл спирта этилового 95 % и фильтровали.

В качестве раствора СО использовали раствор субстанции цифетрилина и вспомогательных веществ в спирте этиловом, а в качестве раствора сравнения – раствор вспомогательных веществ в спирте этиловом.

Измерение оптической плотности (ОП) испытуемого раствора проводили параллельно с измерением ОП раствора СО относительно раствора сравнения в максимуме при длине волны 282 ± 2 нм.

Содержание цифетрилина в таблетке (X, мг) рассчитывали по формуле:

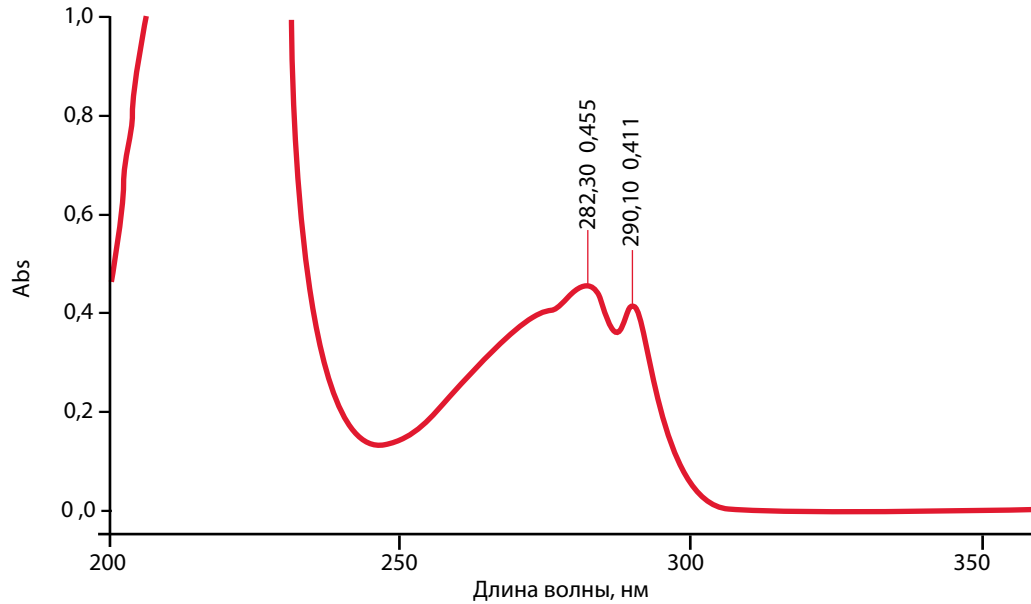


Рис. 1. Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,008 % спиртового раствора субстанции цифетрилина

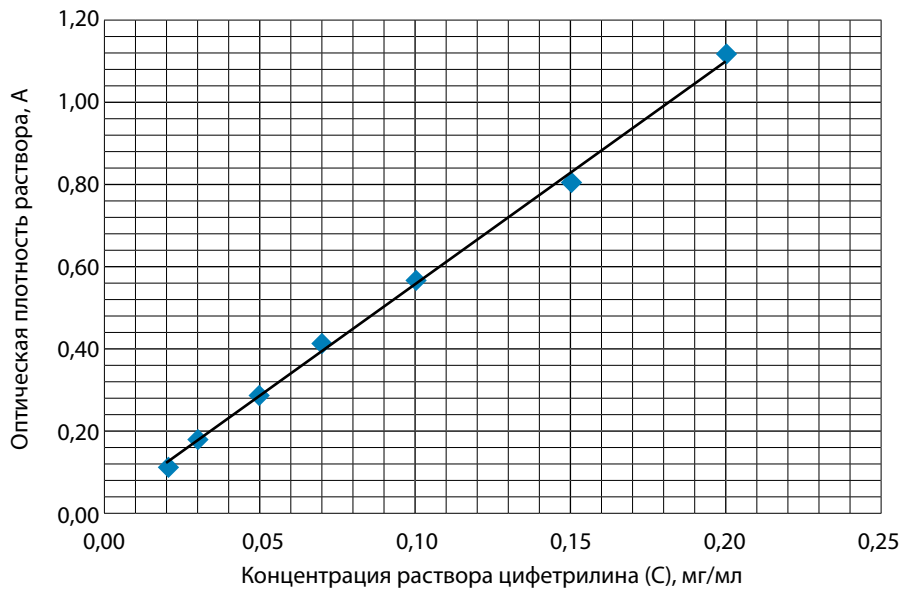


Рис. 2. Зависимость оптической плотности раствора цифетрилина (A) от его концентрации (C)

$$X = \frac{A \times a_0 \times G \times P}{A_0 \times a \times 100},$$

где: A — ОП испытуемого раствора; A_0 — ОП раствора СО; a — навеска испытуемого образца, мг; a_0 — навеска СО, мг; G — средняя масса таблетки, мг; P — содержание цифетрилина в СО, %.

Валидация методики количественного определения

Валидацию разработанной методики количественного определения содержания цифетрилина в препарате цифетрилин, таблетки 6 мг, проводили в соответствии с установленными требованиями [8]

на образцах препарата и модельных смесях, полученных в лабораторных условиях. Исследовали следующие валидационные характеристики: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность).

Главное условие **специфичности** методики — способность безусловно определять анализируемое вещество при наличии других компонентов, которые могут присутствовать в образце, например вспомогательных веществ.

Выше было показано, что присутствие в таблетках цифетрилина вспомогательных веществ не влияет на положение максимумов поглощения в УФ-спек-

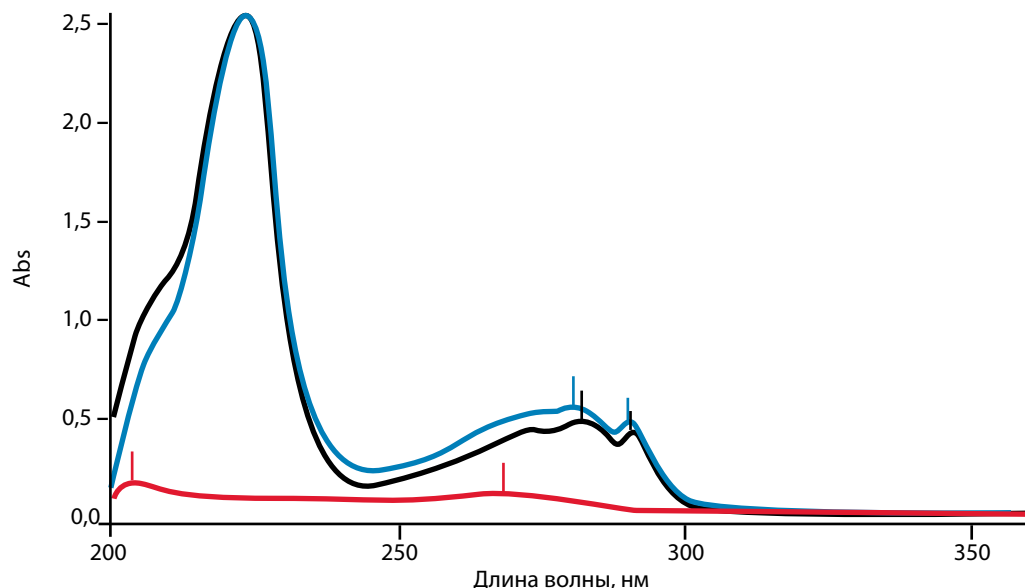


Рис. 3. Ультрафиолетовые спектры поглощения спиртовых растворов субстанции цифетрилина (выделен красным цветом), таблеток цифетрилина (выделен синим цветом) и вспомогательных веществ

трах поглощения. Небольшое собственное поглощение вспомогательных веществ — около 0,08 единиц ОП (см. рис. 3) компенсируется использованием в качестве раствора сравнения раствора вспомогательных веществ, то есть разработанная методика специфична в отношении цифетрилина.

Валидационный параметр «линейность» проверяли экспериментально измерением аналитического сигнала (ОП) для проб с различным содержанием цифетрилина в пределах аналитической области методики — от 70 до 130 % номинального содержания цифетрилина в таблетке. Регрессионный анализ полученных данных проводили методом наименьших квадратов с использованием линейной модели $y = bx + a$ (где x — количество определяемого вещества, y — величина отклика, b — угловой коэффициент, a — свободный член) и рассчитывали коэффициент корреляции r по экспериментально измеренным значениям переменной y для заданных значений аргумента x .

Полученные данные, представленные в табл. 1, показывают, что коэффициент корреляции r , равный 0,995133, отвечает необходимому условию $|r| \geq 0,99$, а результаты количественного определения содержания цифетрилина в препарате по разработанной методике хорошо описываются уравнением линейной зависимости $y = 0,0589x - 0,0099$. Подтверждением линейной зависимости исследуемых величин служит также графическое изображение регрессионной прямой (рис. 4).

Правильность методики подтверждали анализом серии модельных смесей, которые готовились из вспомогательных веществ с добавлением навески, соответствующей 70, 80, 90, 100, 110, 120 и 130 % номинального содержания цифетрилина в препарате.

На каждом уровне проводили 3 определения. Как известно, приемлемыми критериями правильности спектрофотометрической методики являются величина относительной ошибки среднего результата, не превышающая 2,0 %, и отсутствие значимой систематической ошибки. Результаты анализа оценивали, сравнивая полученные результаты с ожидаемым значением величины (содержанием цифетрилина в модельной смеси, мг). Полученные данные приведены в табл. 2, 3.

Таблица 1. Результаты оценки параметров линейной зависимости при количественном определении содержания цифетрилина в модельных смесях

Процент от номинального содержания	Содержание цифетрилина в пробе, мг	Оптическая плотность, ед.	Параметры линейной зависимости $y = bx + a$
70	4,20	0,241	Угловой коэффициент линейной зависимости $b = 0,0589$ Свободный член линейной зависимости $a = -0,0099$ Коэффициент корреляции $r = 0,995133$ $y = 0,0589x - 0,0099$
80	4,80	0,265	
90	5,40	0,308	
100	6,00	0,337	
110	6,60	0,372	
120	7,20	0,408	
130	7,80	0,462	

Как видно из данных, приведенных в табл. 3, относительная ошибка среднего результата ($\epsilon = 1,20$ %) не превышает 2,0 %; результаты лежат внутри доверительного интервала среднего результата анализа ($\bar{x} \pm \Delta x$), который составил $100,68 \pm 1,21$, и прибли-

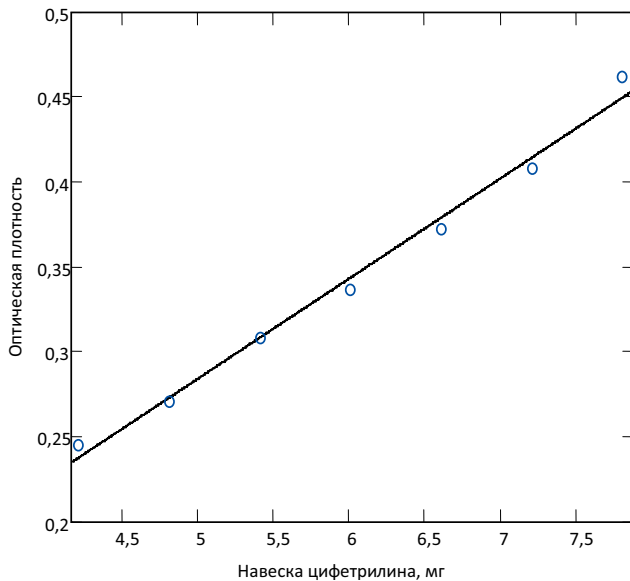


Рис. 4. Регрессионная прямая для количественного определения содержания цифетрилина в таблетках методом спектрофотометрии

жаются к истинному значению. Численное значение коэффициента нормированных отклонений t (коэффициента Стьюдента), рассчитанное по результатам анализа, составило 1,172. Табличное значение коэффициента Стьюдента при 95 % доверительной вероятности и степени свободы $f = 20$ равно 2,086, т. е. $t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}}$ (95 %, 20). Все эти данные позволяют считать, что результаты, полученные нашим методом, являются правильными и не отягощены систематической ошибкой.

Прецизионность исследовали на однородных образцах как сходимость и внутрिलाбораторную (промежуточную) прецизионность.

Сходимость методики оценивали по результатам анализов пробы, полученной растиранием в агатовой ступке 20 таблеток. Анализ проводил в одинаковых условиях с использованием одного и того же спектрофотометра один и тот же исследователь в короткий промежуток времени. Для 2 серий, отличающихся временем выпуска, выполнено по 7 параллельных определений и проведена статистическая обработка полученных результатов. Результаты представлены в табл. 4, 5.

Среднее значение содержания цифетрилина (\bar{x} , мг) в представленных сериях лекарственной формы равно 5,98 и 5,91 мг соответственно и находится

Таблица 2. Результаты оценки правильности методики количественного спектрофотометрического определения содержания цифетрилина в таблетках

Процент от номинального содержания	№ п/п	Содержание цифетрилина в анализируемой пробе, мг	Найдено цифетрилина	
			мг	%
70	1	4,26	4,36	102,35
	2	4,29	4,49	104,65
	3	4,22	4,36	103,26
80	4	4,75	4,89	102,85
	5	4,86	4,74	97,44
	6	4,82	4,73	98,22
90	7	5,46	5,34	97,73
	8	5,34	5,43	101,68
	9	5,43	5,60	103,15
100	10	6,15	6,08	98,86
	11	6,04	5,83	96,62
110	12	5,92	6,08	102,68
	13	6,65	6,52	98,05
	14	6,52	6,74	103,42
120	15	6,70	6,53	97,51
	16	7,25	7,11	98,12
	17	7,32	7,51	102,55
130	18	7,28	7,12	97,76
	19	7,78	7,88	101,32
	20	7,86	8,06	102,55
	21	7,82	8,09	103,48

в пределах установленной нормы (5,4–6,6 мг). Относительная ошибка среднего результата составила 1,66 и 1,57 % соответственно. При доверительной вероятности = 95 % для проанализированных образцов цифетрилина доверительный интервал результата отдельного определения ($\bar{x} \pm \Delta x$) составил $5,98 \pm 0,099$ и $5,91 \pm 0,093$ мг соответственно. Численное значение коэффициента Стьюдента $t_{(p, f)}$, рассчитанное по результатам анализа 2 выборок, составил 0,459 и 0,260

Таблица 3. Метрологические характеристики среднего результата анализа при оценке правильности методики количественного спектрофотометрического определения содержания цифетрилина в таблетках

№	m	f	\bar{X} , %	S^2	S	$S_{\bar{x}}$	P, %	$t(p, f)$ табл.	$t(p, f)$ выч.	Δx	ε , %
1	21	20	100,68	7,04302	2,65387	0,57912	95	2,086	1,172	1,208	1,20

соответственно. Табличное значение коэффициента Стьюдента при 95 % доверительной вероятности и степени свободы $f = 6$ равно 2,45, т. е. $t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}}$ (95 %, 6). Результаты, полученные данным методом, являются сходимыми и не отягощены систематической ошибкой.

При исследовании **внутрилабораторной** (промежуточной) **прецизионности** анализ проводили 2 сотрудника в разные дни. Результаты приведены в табл. 6, 7. При сравнении результатов, полученных 2 сотрудниками, видно, что различия между средними значениями результатов 1-го и 2-го сотрудников незначительны. Относительная ошибка среднего результата для 2 исследователей составила 1,66 и 1,17 % соответственно. Численное значение коэффициент Стьюдента $t_{(p, f)}$, рассчитан по результатам анализа 2 выборок, составил 0,459 и 0,400 соответственно. Табличное значение коэффициент Стьюдента при 95 %

доверительной вероятности и степени свободы $f = 6$ равно 2,45, т. е. $t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}}$ (95 %, 6). Следовательно, методика анализа воспроизводима.

Обобщающий отчет по валидации данной методики количественного определения цифетрилина в таблетках представлен в табл. 8.

Заключение

Разработана и валидирована спектрофотометрическая методика количественного определения содержания основного действующего вещества в лекарственном препарате цифетрилин, таблетки 6 мг. По результатам эксперимента установлено, что данная методика специфична в отношении цифетрилина и обеспечена приемлемой правильностью, сходимостью, прецизионностью и линейностью как при нормальных рабочих концентрациях, так и в экстремальных точках диапазона концентраций.

Таблица 4. Результаты определения сходимости аналитической методики количественного спектрофотометрического определения содержания цифетрилина в таблетках

№ п/п	Найдено цифетрилина в таблетке, мг	
	Серия 02	Серия 03
1	6,05	5,85
2	5,90	5,89
3	5,85	5,81
4	6,13	5,97
5	6,08	5,82
6	5,89	5,93
7	5,97	6,10

Таблица 6. Результаты исследования промежуточной прецизионности методики количественного спектрофотометрического определения содержания цифетрилина в таблетках серии 02

№ п/п	Найдено цифетрилина в таблетке, мг	
	Исследователь 1	Исследователь 2
1	6,05	5,91
2	5,90	6,10
3	5,85	5,97
4	6,13	6,03
5	6,08	5,94
6	5,89	5,91
7	5,97	6,06

Таблица 5. Метрологические характеристики среднего результата анализа при определении сходимости методики количественного спектрофотометрического определения содержания цифетрилина в таблетках

Серия	m	f	\bar{X} , мг	S ²	S	S \bar{x}	P, %	t (p, f) табл.	t (p, f) выч.	Δx	ε , %
02	7	6	5,98	0,01148	0,10715	0,04650	95	2,447	0,459	0,099	1,66
03	7	6	5,91	0,01037	0,10182	0,03848	95	2,447	0,260	0,093	1,57

Таблица 7. Метрологические характеристики среднего результата анализа при определении внутрилабораторной прецизионности методики количественного спектрофотометрического определения содержания цифетрилина в таблетках серии 02

№	m	f	\bar{X} , %	S ²	S	S \bar{x}	P, %	t (p, f) табл.	t (p, f) выч.	Δx	ε , %
1	7	6	5,98	0,01148	0,10715	0,04650	95	2,45	0,459	0,099	1,66
2	7	6	5,99	0,00571	0,07559	0,02857	95	2,45	0,400	0,070	1,17

Таблица 8. Отчет по валидации методики количественного спектрофотометрического определения содержания цифетрилина в таблетках

Аналитическая характеристика	Принятый критерий	Результат
Специфичность	Вспомогательные вещества, входящие в состав таблетки, не должны влиять на положение и величину максимумов в УФ-спектре цифетрилина	Результаты соответствуют принятым критериям. Отклонения не замечены
Линейность	Коэффициент корреляции не менее 0,99	Уравнение линейной зависимости $y = 0,0589x - 0,0099$ Коэффициент корреляции равен 0,995133
Прецизионность (сходимость)	Относительная ошибка среднего результата не более 2,0 %	Относительная ошибка среднего результата равна 1,66 %.
Прецизионность (внутрилабораторная прецизионность)	Относительная ошибка среднего результата не более 2,0 %	Относительная ошибка среднего результата равна 1,41 % Доверительный интервал 0,085
Правильность	Относительная ошибка среднего результата не более 2,0 % в диапазоне концентраций от 70 до 130 % от рабочей концентрации анализируемого вещества. Значения, принимаемые за истинные, должны лежать внутри доверительного интервала	Относительная ошибка среднего результата равна 1,20 % Результаты лежат внутри доверительного интервала ($100,68 \pm 1,21$)
Диапазон аналитического метода	70–130 % от рабочей концентрации	Данная методика обеспечена приемлемой точностью, правильностью и линейностью в экстремальных точках диапазона (70 и 130 %) так же хорошо, как при нормальных рабочих концентрациях

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

- Pless J. The history of somatostatin analogs. *J Endocrinol Invest* 2005;28:1–4. PMID: 16625837.
- Strosberg J.R., Kvols L.K. A review of the current clinical trials for gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Expert Opin Investig Drugs* 2007;16(2):219–24. DOI: 10.1517/13543784.16.2.219. PMID: 17243941.
- Кубасова И.Ю., Смирнова З.С., Осетрова И.П. и др. Изучение противоопухолевой активности структурных аналогов соматостатина. *Российский биотерапевтический журнал* 2003;2(1):29.
- Смирнова Л.И., Смирнова З.С., Устинкина С.В. и др. Синтез и противоопухолевая активность гормона гипоталамуса меланостатина и его аналогов. В кн.: Экспериментальная онкология на рубеже веков. Под ред. М.И. Давыдова и А.Ю. Барышникова. М., 2003. ?
- Шпрах З.С., Ярцева И.В., Смирнова Л.И. и др. Синтез и химико-фармацевтические характеристики аналога соматостатина, обладающего противоопухолевой активностью. *Химико-фармацевтический журнал* 2012;48(3):19–22.
- Михаевич Е.И., Яворская Н.П., Голубева И.С. и др. Исследование возможности создания лекарственной формы Цифетрилина для перорального применения. *Российский биотерапевтический журнал* 2012;11(1):3–8.
- Санарова Е.В., Ланцова А.В., Михаевич Е.И. и др. Перспективность создания лекарственной формы отечественного аналога гипоталамического гормона соматостатина для лечения гормонозависимых опухолей (обзор). *Биофармацевтический журнал* 2016;8(2):14–19.
- Государственная фармакопея Российской Федерации: 13-е изд. М., 2015. Т. 1.
- Ярцева И.В., Игнатьева Е.В., Дмитричева Н.А. и др. Валидация методики количественного определения цифетрилина в лекарственной форме. *Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты»*, Москва. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(1):151.

ИЗУЧЕНИЕ СУБХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ ГЛИКОЗИДНОГО ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛОКАРБАЗОЛА ЛХС-1208 НА КРЫСАХ

А.А. Николина, Н.Ю. Кульбачевская, О.И. Коняева, В.А. Чалей, Н.П. Ермакова, В.М. Бухман
ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва,
Каширское шоссе, 23

Контакты: Алена Андреевна Николина osipova.alio@ya.ru

Введение. В ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России рядом ученых была разработана инъекционная лекарственная форма на основе субстанции гликозидного производного индокарбазола – ЛХС-1208, изучены ее противоопухолевая активность и механизм противоопухолевого действия, что явилось основанием для доклинического изучения токсичности этого препарата.

Цель исследования – изучение субхронической токсичности лекарственной формы гликозидного производного индокарбазола ЛХС-1208 при внутрибрюшинном введении крысам.

Материалы и методы. Лекарственная форма исследуемого препарата: лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 9,0 мг во флаконе. Исследование проведено на 40 здоровых неинбредных крысах-самцах, полученных из разведения ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Было изучено действие препарата на периферическую кровь, функциональное состояние печени, почек и желудочно-кишечного тракта животных.

Результаты. Препарат ЛХС-1208 при ежедневном внутрибрюшинном введении крысам в течение 15 дней в 3 исследованных дозах (суммарные дозы 200, 100 и 50 мг/кг) не вызывал гибели животных, не оказывал влияния на их общее состояние, не вызывал внешних проявлений токсичности, не изменял поведенческие реакции животных и не оказывал влияния на функциональное состояние печени, почек и поджелудочной железы.

Выводы. Полученные результаты изучения субхронической токсичности на крысах явились основанием для дальнейшего доклинического токсикологического изучения лекарственного препарата ЛХС-1208.

Ключевые слова: субхроническая токсичность, производные индокарбазола, ЛХС-1208

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-62-69

RESEARCH OF SUBCHRONIC TOXICITY IN RATS OF GLYCOSIDE DERIVATIVE OF INDOLOCARBAZOLE LCS-1208

A.A. Nikolina, N.Ju. Kul'bachevskaya, O.I. Konjaeva, V.A. Chaley, N.P. Ermakova, V.M. Bukhman
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
23 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Background. In N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center has been developed injectable dosage form based on the substance of indolocarbazole derivative LCS-1208, studied its antitumor activity and mechanism of antitumor effect, which was the basis for the pre-clinical study of the drug toxicity.

Objective. The study of subchronic toxicity of formulation of glycoside derivative of indolocarbazole – LCS-1208 after intraperitoneal application to rats.

Materials and methods. Dosage form of study drug: lyophilisate for preparation of solution for injection of 9,0 mg in vial. The study was conducted on 40 healthy non inbred male rats, which were obtained from the breeding of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center. It was studied the action of the drug on the peripheral blood, the functional state of the liver, kidney and gastrointestinal tract of animals.

Results. The drug LCS-1208 by daily intraperitoneal administration to rats for 15 days in the 3 studied doses (total dose 200 mg/kg, 100 mg/kg and 50 mg/kg) did not cause death of animals, had no effect on the general condition of the animals, did not cause external manifestations of toxicity, did not change behavioral responses of animals and had no effect on the functioning of the studied organs.

Conclusion. The results obtained by the study of the subchronic toxicity in rats were the basis for further preclinical toxicology study of the drug LCS-1208.

Key words: subchronic toxicity, derivatives of indolocarbazole, LCS-1208

Введение

Ранее была продемонстрирована противоопухолевая активность индолокарбазоловых антибиотиков стауроспорина и ребеккамицина [1, 2], что послужило основанием для дальнейшего поиска соединений, проявляющих противоопухолевую активность, среди производных индолокарбазолов [3–7].

В ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России рядом ученых была разработана инъекционная лекарственная форма на основе субстанции гликозидного производного индолокарбазола – ЛХС-1208 [8], изучены ее противоопухолевая активность и механизм противоопухолевого действия [9, 10], что явилось основанием для доклинического изучения токсичности этого препарата.

В предыдущем сообщении [11] были представлены результаты доклинического изучения острой токсичности ЛХС-1208 на мышах и крысах, самках и самцах, при 2 путях введения (внутрибрюшинно и внутривенно). Установлено отсутствие половых отличий для мелких лабораторных животных при 1-кратном внутривенном и внутрибрюшинном введении ЛХС-1208. Расчетные токсические дозы лекарственного препарата ЛХС-1208 получены только при внутрибрюшинном введении мышам-гибридам В6D2F1: для мышей-самок полулетальная доза (LD_{50}) составила 143 (134–170) мг/кг; для мышей-самцов LD_{50} – 143 (136–159) мг/кг, так как при применении ЛХС-1208 в фиксированной концентрации и максимально возможных объемах внутривенно мышам и внутривенно и внутрибрюшинно крысам гибели животных не наблюдали. Установлено, что у мышей и крыс, получавших ЛХС-1208 внутрибрюшинно во всех дозах, наблюдалось дозозависимое снижение массы тела по сравнению с изменениями массы тела контрольных животных. У мышей и крыс, получавших ЛХС-1208 внутривенно, снижения массы тела не наблюдалось.

Полученные результаты изучения острой токсичности явились основанием для дальнейшего доклинического токсикологического изучения лекарственного препарата ЛХС-1208.

Цель исследования – изучение субхронической токсичности лекарственной формы гликозидного производного индолокарбазола ЛХС-1208 при внутрибрюшинном введении крысам.

Материалы и методы

Исследования выполнялись в соответствии с международными и российскими требованиями проведения научных исследований на лабораторных животных [12].

Характеристика тест-системы для определения субхронической токсичности. Работа проведена на 40 здоровых неинбредных крысах-самцах, полученных

из разведения ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все животные были здоровы и находились в стандартных условиях содержания и кормления.

Исследуемый препарат. Наименование лекарственного препарата: ЛХС-1208.

Международное химическое наименование: 6-амино-12-(α -L-арабинопиранозил) индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион.

Соединение синтезировано в лаборатории химического синтеза НИИ ЭДнТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Лекарственная форма: лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 9,0 мг во флаконе. Лекарственная форма создана в лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДнТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Процедура введения. Изучение субхронической токсичности лекарственного препарата ЛХС-1208 серий 110414 и 120414 проводилось на неинбредных крысах-самцах при внутрибрюшинном введении. Содержимое флакона растворяли в воде для инъекций до получения рекомендованной концентрации – 3,0 мг в 1 мл. Препарат вводили крысам внутрибрюшинно ежедневно 15-кратно в 3 дозах, рассчитанных исходя из дозы, полученной в опытах по изучению острой токсичности при введении максимально возможного 1-кратно объема – 100 мг/кг, увеличенной и уменьшенной в 2 раза соответственно: суммарная доза 200 мг/кг (разовая доза 13,3 мг/кг), 100 мг/кг (разовая доза 6,7 мг/кг), 50 мг/кг (разовая доза 3,3 мг/кг).

В каждой группе животных использовали по 10 крыс, 5 крыс из каждой группы выводили из эксперимента на 3-и сутки, остальные 5 – на 30-е сутки после окончания курса введения препарата. Контрольным животным вводили 15-кратно ежедневно внутрибрюшинно 0,9 % физиологический раствор хлорида натрия в объеме 1,0 мл. День последнего введения препарата принимали за нулевые сутки, фоновые показатели измеряли на 18-е сутки.

Время проведения экспериментов. Эксперимент проводился в период с сентября по октябрь 2014 г.

Критерии оценки субхронической токсичности. Критериями оценки субхронической токсичности служили: число павших животных и сроки их гибели, клиническая картина интоксикации, данные клинико-лабораторных исследований, поведенческие реакции и патологические изменения в тканях и внутренних органах, выявляемые при аутопсии павших и выживших животных, выведенных из эксперимента в конце опыта (макроскопическая оценка). Продолжительность наблюдения за животными после 15-кратного ежедневного внутрибрюшинного введения лекарственного препарата ЛХС-1208 составляла 30 сут.

При изучении субхронической токсичности исследовали действие препарата на периферическую кровь, функциональное состояние печени, почек, желудочно-кишечного тракта и других органов животных.

Периферическую кровь животных анализировали на автоматизированном гематологическом анализаторе МЕК-6450К (Nihon Kohden, Япония). Биохимическое исследование крови крыс проводили на биохимическом анализаторе «Hitachi». Анализ мочи проводили на анализаторе мочи «Akray».

Методы статистической обработки данных. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Office Excel и BioStat Professional. Рассчитывали параметры, обычно используемые в токсикологии. За достоверные принимали различия при $p \leq 0,05$. Количественные результаты изменений относительной массы внутренних органов, биохимических показателей крови и показателей периферической крови представлены как среднее значение \pm статистическое отклонение.

Результаты и обсуждение

Общетоксическое действие и переносимость лекарственного препарата ЛХС-1208

при 15-кратном внутрибрюшинном применении

В результате проведенных исследований по изучению субхронической токсичности показано, что ЛХС-1208 в лекарственной форме при 15-кратном ежедневном внутрибрюшинном применении во всех изученных дозах не вызывал гибели животных и внешних проявлений токсичности, не изменял

поведенческие реакции животных. Крысы охотно поедали корм, сохраняли двигательную активность (табл. 1).

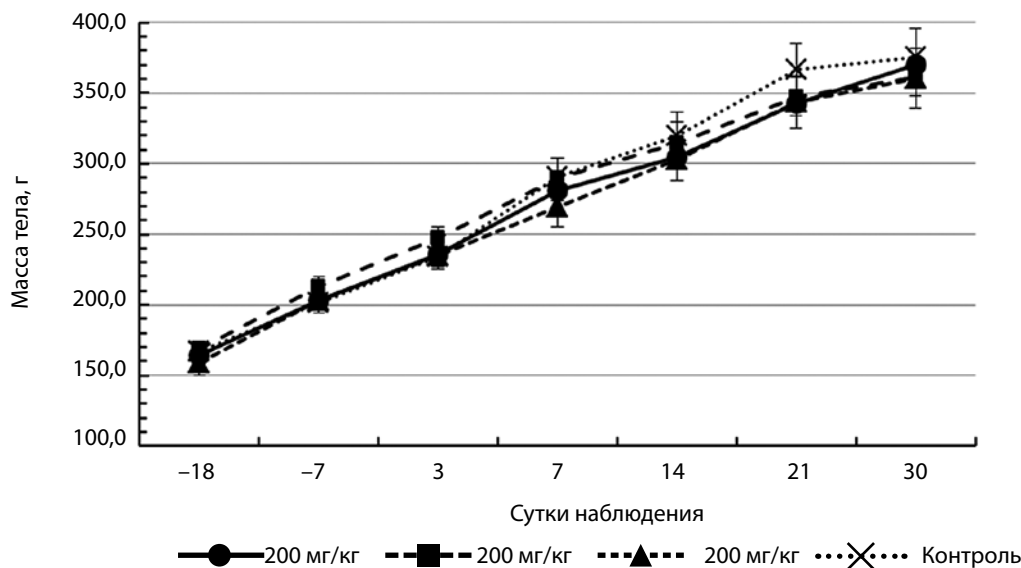
Таблица 1. Гибель животных от токсичности и внешние признаки интоксикации у крыс после 15-кратного ежедневного внутрибрюшинного введения ЛХС-1208

Доза препарата, мг/кг		Погибшие/живые животные	Внешние признаки интоксикации
разовая	суммарная		
13,3	200	0/10	Отсутствовали
6,7	100	0/10	Отсутствовали
3,3	50	0/10	Отсутствовали
Контроль		0/10	Отсутствовали

Установлено, что препарат ЛХС-1208 во всех исследуемых дозах не вызывал снижения массы тела крыс по сравнению с животными контрольной группы как во время введения препарата (-7-е сутки), так и на протяжении всего срока наблюдения. Изменения массы тела крыс, получавших препарат во всех исследованных дозах, колебались в пределах физиологических норм для данного вида животных (см. рисунок).

Влияние лекарственного препарата ЛХС-1208 на периферическую кровь

Клинический анализ крови крыс после 15-кратного ежедневного внутрибрюшинного применения ЛХС-1208 показал, что препарат во всех изученных дозах не влиял на показатели периферической крови крыс на протяжении всего срока наблюдения (30 сут).



Изменения массы тела неинбредных крыс-самцов после 15-кратного ежедневного внутрибрюшинного введения ЛХС-1208. Данные представлены как среднее значение \pm статистическая ошибка

Число лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, количество гемоглобина и показатели гематокрита колебались на уровне показателей периферической крови контрольных крыс и в пределах физиологической нормы для данного вида животных (табл. 2).

После 15-кратного ежедневного внутрибрюшинного введения ЛХС-1208 в исследованных дозах не отмечено изменений в соотношении циркулирующих в периферической крови лимфоцитов и гранулоцитов по сравнению с данными животных контрольной группы (табл. 3).

Таблица 2. Клинический анализ крови неинбредных крыс-самцов после 15-кратного ежедневного внутрибрюшинного введения ЛХС-1208

Доза препарата, разовая/суммарная мг/кг	Результаты					
	Фон (-18-е сутки)	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	30-е сутки
Общее число лейкоцитов, 10⁹/л						
13,3/200	15,8 ± 3,2	14,3 ± 3,5	22,2 ± 3,7	18,2 ± 2,8	23,2 ± 3,4	28,1 ± 14,5
6,7/100	12,6 ± 1,6	12,6 ± 3,3	22,9 ± 4,0	19,7 ± 4,3	22,6 ± 2,3	21,8 ± 20,9
3,3/50	13,9 ± 2,1	14,7 ± 3,5	22,1 ± 4,5	20,6 ± 5,3	20,1 ± 5,9	17,1 ± 15,9
Контроль	13,7 ± 2,6	17,1 ± 3,1	23,4 ± 4,4	20,5 ± 5,1	22,7 ± 12,4	36,3 ± 12,3
Число эритроцитов, 10¹²/л						
13,3/200	5,4 ± 0,5	5,8 ± 0,4	6,4 ± 0,5	6,5 ± 0,4	7,2 ± 0,3	7,1 ± 0,4
6,7/100	5,8 ± 0,1	6,1 ± 0,2	6,2 ± 0,6	6,4 ± 0,3	6,9 ± 0,3	7,2 ± 0,3
3,3/50	5,9 ± 0,6	5,8 ± 0,3	5,9 ± 0,4	6,5 ± 0,4	6,9 ± 0,6	7,0 ± 0,5
Контроль	5,7 ± 0,3	6,0 ± 0,4	6,2 ± 0,5	6,6 ± 0,5	6,7 ± 0,2	6,7 ± 0,2
Количество гемоглобина, г/л						
13,3/200	117 ± 8	123 ± 7	134 ± 7	134 ± 7	145 ± 11	92 ± 19
6,7/100	126 ± 5	130 ± 4	134 ± 14	133 ± 6	137 ± 10	132 ± 66
3,3/50	131 ± 10	124 ± 6	125 ± 11	134 ± 6	114 ± 19	111 ± 61
Контроль	124 ± 9	129 ± 5	133 ± 4	136 ± 4	89 ± 46	96 ± 58
Гематокрит, %						
13,3/200	29,4 ± 1,9	30,1 ± 1,4	32,4 ± 1,7	32,5 ± 1,6	35,3 ± 2,2	34,6 ± 1,4
6,7/100	34,5 ± 1,6	31,9 ± 0,7	31,9 ± 3,3	31,8 ± 1,7	33,8 ± 1,7	34,8 ± 1,5
3,3/50	33,0 ± 2,4	30,3 ± 1,2	30,3 ± 2,4	32,5 ± 1,6	33,7 ± 1,8	33,9 ± 1,8
Контроль	30,8 ± 1,7	31,5 ± 1,5	31,8 ± 1,6	32,9 ± 1,0	33,3 ± 1,3	32,9 ± 2,0
Тромбоциты, 10⁹/л						
13,3/200	499 ± 74	545 ± 85	659 ± 98	515 ± 45	540 ± 52	487 ± 62
6,7/100	545 ± 62	485 ± 83	601 ± 64	477 ± 43	538 ± 37	531 ± 36
3,3/50	644 ± 81	509 ± 63	451 ± 95	522 ± 75	555 ± 84	521 ± 104
Контроль	569 ± 60	546 ± 51	642 ± 73	500 ± 42	536 ± 57	649 ± 56

Таблица 3. Соотношение лимфоцитов и гранулоцитов в крови неинbredных крыс-самцов после 15-кратного ежедневного внутрибрюшинного введения ЛХС-1208 (на 100 клеток)

Доза препарата, разовая/суммарная, мг/кг	Лимфоциты, %	Гранулоциты, %
Фон (–18-е сутки)		
13,3/200	38 ± 7	62 ± 7
6,7/100	48 ± 10	52 ± 10
3,3/50	38 ± 7	62 ± 7
Контроль	41 ± 6	58 ± 6
3-и сутки		
13,3/200	52 ± 11	48 ± 11
6,7/100	61 ± 8	39 ± 8
3,3/50	49 ± 10	51 ± 10
Контроль	58 ± 5	42 ± 5
7-е сутки		
13,3/200	46 ± 17	54 ± 17
6,7/100	50 ± 11	50 ± 11
3,3/50	53 ± 13	47 ± 13
Контроль	47 ± 14	53 ± 14
14-е сутки		
13,3/200	56 ± 6	44 ± 6
6,7/100	52 ± 15	48 ± 15
3,3/50	54 ± 8	46 ± 8
Контроль	51 ± 8	49 ± 8
21-е сутки		
13,3/200	45 ± 7	55 ± 7
6,7/100	48 ± 8	52 ± 8
3,3/50	38 ± 13	62 ± 13
Контроль	66 ± 16	34 ± 16
30-е сутки		
13,3/200	44 ± 13	56 ± 13
6,7/100	57 ± 13	43 ± 13
3,3/50	58 ± 13	42 ± 10
Контроль	69 ± 2	31 ± 2

Влияние лекарственного препарата ЛХС-1208 на функции печени

Для определения повреждающего действия ЛХС-1208 на печень крыс после 15-кратного ежедневного внутрибрюшинного введения исследовали уровень альбумина, общего белка, активность аспаратами-

нотрансферазы и аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы и лактатдегидрогеназы, а также уровень билирубина в сыворотке крови животных. Установлено, что препарат во всех исследованных дозах во все сроки наблюдения не оказывал влияния на функции печени, уровень биомаркеров колебался на уровне показателей контрольных крыс и в пределах физиологической нормы для данного вида животных (табл. 4).

Таблица 4. Биохимические показатели крови неинbredных крыс-самцов после 15-кратного ежедневного внутрибрюшинного введения ЛХС-1208

Доза препарата, разовая/суммарная, мг/кг	Биохимический показатель	Результаты	
		3-и сутки	30-е сутки
13,3/200	Белок, г/л	51,5 ± 1,5	63,5 ± 1,3
6,7/100		52,4 ± 6,0	64,2 ± 2,7
3,3/50		53,3 ± 4,0	66,6 ± 3,5
Контроль		52,8 ± 2,9	66,7 ± 4,1
13,3/200	Альбумин, г/л	29,4 ± 0,5	35,8 ± 1,6
6,7/100		30,2 ± 3,1	35,6 ± 1,9
3,3/50		30,0 ± 2,2	37,4 ± 1,3
Контроль		29,8 ± 2,0	35,4 ± 3,3
13,3/200	Аланинаминотрансфераза, Ед/л	25,8 ± 1,3	26,2 ± 4,1
6,7/100		26,2 ± 5,4	25,4 ± 3,8
3,3/50		28,8 ± 1,5	28,2 ± 3,3
Контроль		29,0 ± 3,5	31,4 ± 4,0
13,3/200	Аспаратаминотрансфераза, Ед/л	97 ± 18	117 ± 21
6,7/100		116 ± 34	95 ± 10
3,3/50		109 ± 7	110 ± 20
Контроль		116 ± 17	124 ± 24
13,3/200	Лактатдегидрогеназа, Ед/л	1499 ± 677	2062 ± 858
6,7/100		2146 ± 1014	1343 ± 375
3,3/50		1721 ± 329	1863 ± 1013
Контроль		1620 ± 515	1941 ± 735
13,3/200	Щелочная фосфатаза, Ед/л	360 ± 51	314 ± 109
6,7/100		417 ± 101	209 ± 27
3,3/50		371 ± 74	270 ± 53
Контроль		524 ± 128	273 ± 52
13,3/200	Билирубин, мкмоль/л	0,8 ± 0,3	1,1 ± 0,4
6,7/100		0,6 ± 0,3	1,2 ± 0,2
3,3/50		0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,4
Контроль		0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,4

Влияние лекарственного препарата ЛХС-1208 на функции почек

В результате проведенных исследований влияния ЛХС-1208 на функции почек установлено, что при ежедневном внутривнутрибрюшинном применении препарата в течение 15 дней во всех исследованных дозах содержание мочевины и креатинина в сыворотке крови крыс не отличалось от соответствующих биохимических показателей контрольных животных (табл. 5).

При ежедневном внутривнутрибрюшинном введении ЛХС-1208 в течение 15 дней не было отмечено отклонений в клиническом анализе мочи и суточном диурезе крыс на 3, 15 и 30-е сутки наблюдения по сравнению с фоновыми значениями и данными контрольных животных (табл. 6).

Влияние лекарственного препарата ЛХС-1208 на углеводный обмен

Для оценки влияния ЛХС-1208 на углеводный обмен и функцию поджелудочной железы у крыс

Таблица 5. Биохимические показатели крови неинбредных крыс-самцов после 15-кратного ежедневного внутривнутрибрюшинного введения ЛХС-1208

Доза препарата, разовая/суммарная, мг/кг	Показатель	Результаты	
		3	30
13,3/200,0	Мочевина, ммоль/л	7,7 ± 0,4	5,8 ± 0,5
6,7/100,0		6,8 ± 1,1	6,7 ± 0,7
3,3/50,0		5,3 ± 0,5	6,5 ± 0,5
Контроль		5,6 ± 0,6	6,1 ± 0,9
13,3/200,0	Креатинин, ммоль/л	39,4 ± 1,7	54,6 ± 3,8
6,7/100,0		40,4 ± 4,2	56,2 ± 3,6
3,3/50,0		36,0 ± 1,6	57,8 ± 5,8
Контроль		38,2 ± 1,9	55,8 ± 3,7

Таблица 6. Диурез и клинический анализ мочи неинбредных крыс-самцов после 15-кратного ежедневного внутривнутрибрюшинного введения ЛХС-1208

Доза препарата, разовая /суммарная, мг/кг	Диурез			рН	Удельный вес	Качественное изменение
	Выпито, мл	Выделено, мл	%			
Фон (-18-е сутки)						
13,3/200	19,0	17,3	91,1	6,0	1020	Солей много, преимущественно ураты, слизи умеренно
6,7/100	10,0	11,0	110,0	6,0	1025	
3,3/50	6,0	6,6	110,0	6,5	1025	
Контроль	20,0	22,0	110,0	6,0	1030	
3-и сутки						
13,3/200	15,7	13,7	87,3	7,0	1020	Солей много, преимущественно ураты, слизи умеренно
6,7/100	16,3	18,7	114,7	7,0	1020	
3,3/50	13,0	11,1	84,6	6,0	1030	
Контроль	18,0	16,7	92,7	7,0	1020	
15-е сутки						
13,3/200	17,7	13,7	77,4	6,5	1030	Солей много, преимущественно ураты, слизи умеренно
6,7/100	19,5	15,0	76,9	6,5	1030	
3,3/50	16,7	14,0	89,2	7,0	1025	
Контроль	19,0	17,7	93,0	7,0	1025	
30-е сутки						
13,3/200	20,0	16,8	84,0	6,0	1025	Солей много, преимущественно ураты, слизи умеренно
6,7/100	20,0	16,7	83,5	7,0	1030	
3,3/50	19,3	19,0	98,4	7,0	1025	
Контроль	17,7	15,7	88,7	7,0	1030	

определяли содержание глюкозы в сыворотке крови. Проведенные исследования субхронической токсичности показали, что препарат после 15-кратного ежедневного внутрибрюшинного введения во всех исследованных дозах не влиял на уровень глюкозы в сыворотке крови животных по сравнению с данными контрольных животных (табл. 7).

Таблица 7. Биохимические показатели крови неинбредных крыс-самцов после 15-кратного ежедневного внутрибрюшинного введения ЛХС-1208

Доза препарата, разовая/суммарная, мг/кг	Глюкоза, ммоль/л	
	3-и сутки	30-е сутки
13,3/200	2,8 ± 0,2	6,9 ± 0,7
6,7/100	3,5 ± 0,4	6,9 ± 0,5
3,3/50	3,3 ± 0,3	7,0 ± 1,0
Контроль	4,7 ± 0,5	5,8 ± 1,0

Данные морфометрического анализа внутренних органов

При морфометрическом анализе массы внутренних органов крыс было установлено, что 15-кратное внутрибрюшинное ежедневное применение лекарственного препарата ЛХС-1208 во всех исследованных дозах не оказывало влияния на массу внутренних органов крыс по сравнению с данными контрольных животных (табл. 8).

Заключение

Изучена субхроническая токсичность лекарственного препарата ЛХС-1208 при 15-кратном ежедневном внутрибрюшинном введении крысам в суммарных дозах 50, 100 и 200 мг/кг. Препарат ЛХС-1208 при ежедневном внутрибрюшинном применении в течение 15 дней в 3 исследованных дозах не вызывал гибели животных, не оказывал влияния на их общее состояние, не вызывал внешних проявлений токсичности, не изменял поведенческие реакции животных, не вызывал изменений показателей пери-

Таблица 8. Относительная масса внутренних органов (на 100 г массы тела) неинбредных крыс-самцов после 15-кратного ежедневного внутрибрюшинного введения ЛХС-1208

Доза препарата, разовая/суммарная, мг/кг	Орган	Относительная масса органов, г	
		3-и сутки	30-е сутки
13,3/200	Тимус	0,28 ± 0,08	0,17 ± 0,03
6,7/100		0,26 ± 0,07	0,17 ± 0,02
3,3/50		0,27 ± 0,08	0,18 ± 0,03
Контроль		0,26 ± 0,05	0,16 ± 0,03
13,3/200	Сердце	0,41 ± 0,06	0,33 ± 0,02
6,7/100		0,38 ± 0,04	0,32 ± 0,03
3,3/50		0,38 ± 0,03	0,31 ± 0,02
Контроль		0,47 ± 0,12	0,35 ± 0,05
13,3/200	Печень	3,36 ± 0,10	2,96 ± 0,22
6,7/100		3,42 ± 0,21	2,91 ± 0,14
3,3/50		3,51 ± 0,19	2,92 ± 0,24
Контроль		4,00 ± 0,70	2,90 ± 0,27
13,3/200	Почки	0,40 ± 0,03	0,32 ± 0,01
6,7/100		0,39 ± 0,02	0,31 ± 0,03
3,3/50		0,39 ± 0,02	0,31 ± 0,02
Контроль		0,46 ± 0,09	0,32 ± 0,01
13,3/200	Селезенка	0,35 ± 0,06	0,25 ± 0,04
6,7/100		0,31 ± 0,03	0,27 ± 0,03
3,3/50		0,32 ± 0,05	0,27 ± 0,08
Контроль		0,34 ± 0,10	0,25 ± 0,02

ферической крови животных и не оказывал влияния на функциональное состояние печени, почек и поджелудочной железы.

Полученные результаты изучения субхронической токсичности на крысах явились основанием для дальнейшего доклинического токсикологического изучения лекарственного препарата ЛХС-1208.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Meng L.-H., Liao Z.-Y., Pommier Y. Non-camptothecin DNK topoisomerase I inhibitors in cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 2003;3(3):305–20. PMID:12570765.
2. Sordet O., Khan Q.A., Kohn K.W., Pommier Y. Apoptosis induced by topoisomerase

inhibitors. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003;3(4):271–90. PMID:12769773.
3. Civenni G., Longoni N., Costales P. et al. EC-70124, a novel glycosylated indolocarbazole multikinase inhibitor, reverts tumorigenic and stem cell properties in prostate

cancer by inhibiting STAT3 and NF-κB. *Mol Cancer Ther* 2016;15(5):806–18. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-15-079. PMID:26826115.
4. El Sayed M.T., Ahmed K.M., Mahmoud K., Hilgeroth A. Synthesis, cytostatic evaluation

- and structure activity relationships of novel bis-indolylmethanes and their corresponding tetrahydroindolocarbazoles. *Eur J Med Chem* 2015;90:845–59. DOI: 10.1016/j.ejmech. 2014.12.008. PMID: 25528338.
5. Sherer C., Snape T.J. Heterocyclic scaffolds as promising anticancer agents against tumours of the central nervous system: exploring the scope of indole and carbazole derivatives. *Eur J Med Chem* 2015;97:552–60. DOI: 10.1016/j.ejmech. 2014.11.007. PMID: 25466446.
6. Singh S., Kim Y., Wang F. et al. Structural characterization of AtmS13, a putative sugar aminotransferase involved in indolocarbazole AT2433 aminopentose biosynthesis. *Proteins* 2015;83(8): 1547–54. DOI:10.1002/prot.24844. PMID:26061967.
7. Yoshida A., Ookura M., Zokumasu K., Ueda T. G06976, a FLT3 kinase inhibitor, exerts potent cytotoxic activity against acute leukemia via inhibition of survivin and MCL-1. *Biochem Pharmacol* 2014;90(1):16–24. DOI:10.1016/j.bcp. 2014.04.002. PMID: 24735609.
8. Ланцова А.В., Санарова Е.В., Оборотова Н.А. и др. Разработка технологии получения инъекционной лекарственной формы на основе отечественной субстанции производной индолокарбазола – ЛХС-1208. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;12(3):25–32.
9. Киселева М.П., Шпрах З.С., Борисова Л.М. и др. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208. *Сообщение I. Рос- сийский биотерапевтический журнал* 2015;14(2):71–7.
10. Киселева М.П., Шпрах З.С., Борисова Л.М. и др. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208. *Сообщение II. Рос- сийский биотерапевтический журнал* 2015;14(3):41–7.
11. Николина А.А., Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И. и др. Изучение острой токсичности нового противоопухолевого лекарственного средства на основе производного индолокарбазола – ЛХС-1208. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(4):59–64.
12. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. М., 2005. С. 170–203.

АЛГОРИТМ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ПРОСТАТСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА У БОЛЬНЫХ АДЕНОКАРЦИНОМОЙ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Д.Ю. Блохин¹, П.К. Иванов¹, Н.К. Власенкова¹, И.В. Чинарева¹, И.Б. Шоуа²

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²ООО «Медицинский научный центр «МедБиоСпектр»; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Дмитрий Юрьевич Блохин blokhin@yandex.ru

Введение. Концентрация простатспецифического антигена (ПСА) в сыворотке крови значительно повышается при развитии аденокарциномы предстательной железы (ПЖ), в десятки и сотни раз превышая предельные значения диапазона определяемых концентраций для всех существующих диагностических тест-систем, что ограничивает возможности их применения для систематического мониторинга состояния больных и обеспечения эффективности проводимого лечения. Вместе с тем изменение стандартного алгоритма выполнения лабораторного анализа, изложенного в инструкциях к соответствующим тест-системам, позволяет существенно расширить диапазон определяемых концентраций ПСА.

Цель исследования – создание алгоритма количественного определения общего ПСА в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА), пригодного одновременно для первичной лабораторной диагностики, скрининга и систематического мониторинга состояния больных с верифицированным диагнозом аденокарциномы ПЖ.

Материалы и методы. В работе использованы серийно производимые ИФА-наборы реагентов для количественного определения уровня общего ПСА в сыворотке крови, сертифицированные МЗ РФ для клинической лабораторной диагностики. В исследовании применялись образцы сыворотки крови практически здоровых лиц, больных неопухолевыми заболеваниями ПЖ, больных с доброкачественной гиперплазией, а также больных с верифицированным диагнозом аденокарциномы ПЖ, в том числе в стадии диссеминации опухолевого процесса.

Результаты. Показано, что при последовательном 2-кратном разведении исходного образца сыворотки крови «нулевым» стандартом из состава набора линейность определяемой концентрации общего ПСА сохраняется до разведения в 1024 раза, что позволяет корректно выполнить измерение уровня аналита в диапазоне до 30 000 нг/мл.

Выводы. Разработан и апробирован простой алгоритм выполнения количественного определения ПСА методом ИФА у больных аденокарциномой ПЖ.

Ключевые слова: простатспецифический антиген, иммуноферментный анализ, аденокарцинома предстательной железы

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-70-78

THE ALGORITHM OF QUANTITATIVE DETECTION OF PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN AT PATIENTS WITH A PROSTATE ADENOCARCINOMA

D. Yu. Blokhin¹, P. K. Ivanov¹, N. K. Vlasenkova¹, I. V. Chinareva¹, I. B. Showa²

¹N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia;

²“Medical and Research Center MedBioSpectrum”, Ltd; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Background. Concentration of a prostate specific antigen (PSA) in blood serum considerably increases in case of development of a prostate adenocarcinoma, in tens and hundreds times exceeding extreme values of the range of the determined concentration for all existing diagnostic test systems that limits possibilities of their application for the purpose of systematic monitoring of a condition of patients and efficiency of the treatment. At the same time, change of standard algorithm of accomplishment of the laboratory analysis stated in instructions to the relevant test systems allows to expand the range of the determined concentration of the PSA significantly.

Objective. The present research is executed for the purpose of creation of algorithm of quantitative detection of the total PSA concentration in blood serum specimens by enzyme immunoassay (EIA) suitable at the same time for primary laboratory diagnostics, screening and systematic monitoring of a condition of patients with the verified diagnosis of a prostate adenocarcinoma.

Materials and methods. In present investigation serially made EIA-kits for quantitative determination of level of a total PSA blood serum specimens certified by the Russian Ministry of Health for clinical laboratory diagnostics are used. In research samples of blood serum of almost healthy donors, and also patients with not tumoral diseases of a prostate, and also patients with the verified diagnosis of a prostate adenocarcinoma, including in a stage of a dissemination of tumoral process were applied.

Results. It is shown that linearity of the defined concentration of the total PSA at consecutive two-fold dilutions of blood serum samples by the “zero” standard remains dilution up to 1024 times that allows to execute correctly measurement of total PSA level in the range up to 30 000 ng/ml.

Conclusion. *The simple algorithm of performance of quantitative detection of PSA by EIA at patients with a prostate adenocarcinoma is developed and approved.*

Key words: *prostate specific antigen, enzyme immunoassay, prostate adenocarcinoma*

Введение

Простатический специфический антиген (ПСА), являясь опухолевым маркером рака предстательной железы (РПЖ), с 1980 годов широко используется в клинической лабораторной практике для диагностики этого заболевания, мониторинга эффективности проводимого лечения, а в ряде стран также для скрининга мужского населения при формировании группы риска по поводу аденокарциномы предстательной железы (ПЖ).

ПСА является гликопротеидом с молекулярной массой около 32 кДа, состоящим из 1 полипептидной цепи и имеющим протеиназную ферментативную активность. ПСА органоспецифично продуцируется клетками ПЖ и накапливается в высокой концентрации в составе секрета ПЖ. В норме незначительная часть ПСА попадает в кровотоки и присутствует в сыворотке крови в свободной форме (свПСА), а также в форме комплексов с плазматическими белками — α -1-антихимотрипсином и α -2-макроглобулином. В последней форме молекула ПСА полностью экранирована и недоступна для обнаружения обычными иммунометрическими методами, а 1-я и 2-я формы могут быть количественно определены в иммуоферментном (ИФА), иммунофлуоресцентном или радиоиммунном анализе как собственно свПСА и суммарный (общий) ПСА (оПСА), включающий обе формы. В норме ПСА в сыворотке крови женщин обнаруживается лишь в следовых количествах, в то время как у мужчин его концентрация достаточно постоянна и составляет 1–3 нг/мл, несколько повышаясь с возрастом. Воспалительные заболевания ПЖ (простатит, абсцесс), ишемия и инфаркт ПЖ, а также механические микротравмы ее ткани (в том числе в результате массажа ПЖ) могут сопровождаться временным повышением концентрации ПСА в сыворотке, что следует учитывать при назначении данного исследования и в интерпретации результатов. Некоторые факторы, прямо не связанные с патологией ПЖ, также могут оказывать влияние на уровень ПСА в сыворотке крови. При проведении массового скрининга и ранней диагностики опухолей ПЖ верхней границей нормы условно считают концентрацию ПСА до 4 нг/мл, что соответствует низкой встречаемости аденокарциномы ПЖ у мужчин с таким уровнем маркера [1]. Стойкое повышение концентрации ПСА в крови сопровождает гиперпластические заболевания ПЖ, что и определяет диагностическую ценность такого анализа. В то же время концентра-

ция ПСА от 4 до 10 нг/мл трактуется как «серая зона», которая не исключает наличия аденокарциномы, но может быть обусловлена доброкачественной гиперплазией предстательной железы (аденомой) или возрастными изменениями в ней. В такой ситуации полезную информацию для дифференциальной диагностики дает динамическое наблюдение — повышение уровня ПСА более чем на 0,75 нг/мл в год является показанием для биопсии даже при абсолютной концентрации ПСА ниже ее порогового значения [2]. Более высокие концентрации ПСА связаны, как правило, с наличием уже развивающейся аденокарциномы ПЖ, что требует углубленного обследования пациента, в том числе биопсии. Клиническая практика показала, что дальнейшее повышение концентрации ПСА в сыворотке крови более 20 нг/мл связано с высоким риском появления региональных, а более 50 нг/мл — отдаленных метастазов РПЖ; уровень ПСА, превышающий 100 нг/мл, достоверно свидетельствует о диссеминации опухолевого процесса [3]. Таким образом, кроме первичной диагностики РПЖ, уровень ПСА в сыворотке крови является надежным лабораторным критерием наличия региональных и отдаленных метастазов, а также используется для мониторинга эффективности лучевого, гормонального или химиотерапевтического лечения и прогноза заболевания [4].

На российском рынке продукции медицинского назначения в настоящее время представлены наборы реагентов для количественного определения оПСА в сыворотке крови человека методом ИФА, выпускаемые несколькими отечественными производителями и аттестованные Минздравом России в качестве средства клинической лабораторной диагностики. Это ИФА-тест-системы производства «НВО Иммунотех» и «ХЕМА-Медика» (Москва), «Алкор Био» (Санкт-Петербург), «Вектор-Бест» (Новосибирск). Доступны также ИФА-наборы импортного производства (CanAg Diagnostics, Швеция; DRG Diagnostics, Германия, и др.). С одной стороны, наличие выбора средств клинической лабораторной диагностики расширяет ее аналитические возможности, а с другой — эти возможности ограничены различиями в технико-аналитических характеристиках этих тест-систем. Во всех ИФА-наборах рабочей «молекулярной машиной» является пара моноспецифичных антител, как правило, моноклональных, поэтому итоговые характеристики набора прямо связаны с индивидуальными свойствами антител (аффинностью, авидностью),

а также с тем, насколько адекватно эти антитела работают вместе. С уникальными свойствами этой пары связаны не только основные аналитические характеристики конкретного ИФА-набора (чувствительность, специфичность, точность, воспроизводимость результатов анализа), но и значимые технические характеристики: диапазон определяемых концентраций аналита, линейность результатов определения, допустимость разведения анализируемого образца разбавителями для расширения диапазона измерений. Поскольку все производители ИФА-наборов используют для изготовления собственные технические регламенты, разработанные для доступной данному производителю конкретной пары антител, итоговые технико-аналитические характеристики наборов от разных производителей заметно различаются.

Так, в сравнительных исследованиях, выполненных одним из российских производителей ИФА-наборов, показано, что абсолютные значения определяемой концентрации ПСА в образцах сыворотки крови могут различаться на 44–120 % при использовании тест-систем разных производителей [5]. Для применения в качестве средства первичной лабораторной диагностики пригоден любой из сравниваемых ИФА-наборов (при условии определения внутреннего лабораторного диапазона нормальных значений аналита для каждого из них). Но при мониторинге концентрации ПСА в систематических исследованиях для получения объективного результата следует использовать наборы одного производителя [6].

Кроме того, серийно выпускаемые ИФА-наборы имеют достаточно узкий диапазон определяемых концентраций ПСА – от 0–25 нг/мл (DRG Diagnostics) до 0–60 нг/мл (CanAg Diagnostics), чего недостаточно для мониторинга состояния пациентов с верифицированным диагнозом аденокарциномы ПЖ. Это особенно важно на стадии диссеминации опухолевого процесса, когда концентрация ПСА в сыворотке крови достигает значений в сотни и даже тысячи нанограммов на миллилитр. Если определяемая концентрация ПСА в образце превышает диапазон калибровочной кривой, производители ИФА-наборов в инструкциях рекомендуют произвести повторное определение, разведя образец исходной сыворотки в 10 раз специальным раствором для разведения образца («Вектор-Бест»), сывороткой крови с ранее определенным низким уровнем ПСА (CanAg Diagnostics) или «нулевым» стандартом, входящим в состав набора (DRG Diagnostics), и вычислить исходную концентрацию ПСА с учетом фактора разведения. Применение рекомендованных производителем разбавителей позволяет избежать искажения полученных результатов анализа при повторном тестировании [5]. Дополнительным препятствием при анализе

образцов с очень высоким содержанием определяемого аналита является возможность возникновения так называемого хук-эффекта (hook effect) – существенного, вплоть до нуля, занижения концентрации определяемого антигена [6]. Этот эффект может возникать при использовании для анализа ИФА-наборов с одностадийной постановкой твердофазной реакции, в которой инкубация образца, содержащего определяемый антиген, и иммуноферментного конъюгата моноклональных антител выполняется в лунке планшета одновременно. Возможность возникновения хук-эффекта и концентрация антигена, при которой он может проявляться, исследуются еще на этапе разработки тест-системы [7], и они должны быть указаны в инструкции к набору. Производители сравниваемых ИФА-наборов информируют, что хук-эффект при использовании выпускаемых ими тест-систем может наблюдаться при концентрации ПСА в образце более 2000 нг/мл (DRG Diagnostics) и более 3000 нг/мл (CanAg Diagnostics). При использовании ИФА-набора производства «Вектор-бест» при любой концентрации ПСА хук-эффект не возникает, поскольку в этом наборе реализована двухстадийная схема постановки реакции [4].

Цель исследования – создание алгоритма количественного определения оПСА в сыворотке крови человека методом ИФА, пригодного одновременно для первичной лабораторной диагностики, скрининга и систематического мониторинга состояния больных с верифицированным диагнозом аденокарциномы ПЖ.

Материалы и методы

В качестве рабочего ИФА-набора для количественного определения оПСА в сыворотке крови человека использован сертифицированный МЗ РФ для клинической лабораторной диагностики набор «ИммуноФА-ПСА», серийно выпускаемый ЗАО «НВО Иммунотех» (Москва). Набор имеет стандартный планшетный формат, реализованный в стрипованном варианте (12 стрипов по 8 лунок), предусматривает одностадийную постановку теста с использованием стандартных образцов 6 уровней концентрации и образца контрольной сыворотки, процедуру разведения в необходимых случаях исследуемого образца сыворотки «нулевым» стандартом, входящим в состав набора, без потери линейности измеряемых значений. При выполнении сравнительных измерений (кросс-валидация, cross-validation) в качестве референтного использован ИФА-набор «CanAg PSA total EIA» (CanAg Diagnostics, Швеция). Постановку иммуноферментных реакций производили в соответствии с инструкциями к соответствующим наборам, учет результатов реакции проводили на фотометре вертикального сканирования планшетного формата

MCC/340 (Flow Lab., США) или BioTrak II (Amersham BioSci., Великобритания) при длине волны 450 нм, результаты измерений обрабатывали с помощью программы ELISAFIT.

В качестве объекта сравнительного исследования использованы образцы сыворотки крови, полученные в ООО «Медицинский научный центр «МедБиоСпектр» в процессе клинического диагностического лабораторного обследования пациентов мужского пола в соответствии с медицинским назначением и их информированным согласием на использование компонентов крови в научных целях. В группу включены 50 пациентов, страдавших доброкачественной аденомой ПЖ, с диагнозом хронического простатита и больных с верифицированным диагнозом аденокарциномы ПЖ, а также пациенты без выявленной патологии ПЖ (панель K50).

Определение диапазона нормальных значений уровня оПСА в сыворотке крови выполнено у 85 практически здоровых мужчин в возрасте 18–69 лет, проходивших профилактическое диспансерное обследование в ООО «Медицинский научный центр МедБиоСпектр» (панель H85).

Мониторинговые исследования уровня оПСА выполнены в группе пациентов, проходивших химиотерапевтическое лечение по поводу диссеминированной аденокарциномы ПЖ в медицинских учреждениях г. Москвы при лабораторном сопровождении (мониторинг показателей ПСА) в клинико-диагностической лаборатории ООО «Медицинский научный центр «МедБиоСпектр». Постановку реакций выполняли в соответствии с разработанным алгоритмом серийных разведений образцов сыворотки крови, учет результатов реакции проводили на фотометрах MCC/340 (Flow Lab., США) или BioTrak II (Amersham BioSci., Великобритания) при длине волны 450 нм или с использованием автоматического иммуноферментного анализатора «Alisei» Quality System (Radim Group, Италия).

В работе также использованы образцы сыворотки крови больных с диссеминированной аденокарциномой ПЖ (панель АСР48) и контрольный образец сыворотки Lyphochek Level 3 (BioRad, США), Lot #40163 – L3 с концентрацией ПСА в диапазоне 13–36 нг/мл.

Результаты

Результаты измерения уровня оПСА 2 диагностическими наборами в одних и тех же образцах сыворотки крови (панель K50) попарно представлены в табл. 1.

Из приведенных данных видно, что определяемые набором «ИммуноФА-ПСА» концентрации анализата на 15–30 % выше аналогичных, определяемых набором «CanAg PSA total EIA», однако между значениями, определенными с использованием обоих диагности-

ческих ИФА-наборов, имеется прямая корреляция. График аппроксимации и уравнение регрессии приведен на рис. 1. Величина достоверности аппроксимации ($R^2 = 0,9816$) свидетельствует о высокой степени сопоставимости результатов, полученных разными методами.

Тест на воспроизводимость результатов анализа выполнен с использованием набора «ИммуноФА-ПСА» и образцов сыворотки из панели K50 (образцы K-4, K-18 и K-38) с умеренно повышенным, нормальным и высоким уровнями ПСА путем 10-кратной постановки иммуноферментной реакции в каждой из 4 независимых аналитических сессий (табл. 2).

Диапазон нормальных значений уровня оПСА в сыворотке крови ($X_{cp} \pm 2 SD$), определенный с использованием ИФА-набора «ИммуноФА-ПСА», составил $1,50 \pm 2,22$ нг/мл (интервал 0–3,72 нг/мл). Асимметричный характер распределения значений (рис. 2) свидетельствует о негомогенном составе выборки, связанном, возможно, с различными возрастными группами доноров и с наличием у части из них невыявленных гиперпластических заболеваний ПЖ. Таким образом, в диапазон значений $1,50 \pm 2,22$ (0–3,72) нг/мл попадают 95 % результатов из всей выборки ($n = 85$).

В случаях, когда уровень ПСА в образце сыворотки превышает диапазон определяемых концентраций, производитель диагностического ИФА-набора «ИммуноФА-ПСА» рекомендует выполнить 10-кратное разведение исходного образца сыворотки «нулевым» стандартом из набора и повторить постановку иммуноферментной реакции для расчета исходной концентрации анализата с учетом фактора разведения. Для подтверждения сохранения линейности определения уровня ПСА нами использованы серийные 2-кратные разведения контрольного материала с высоким уровнем анализата Lyphochek Level 3 и образцы сыворотки крови пациентов с гистологически подтвержденной аденокарциномой ПЖ (из панели АСР48). Определение концентрации ПСА в образцах, полученных в результате серийных 2-кратных разведений исходного материала (в 2, 4, 8, 16... раз), выполнено в триплетах (n_1 , n_2 и n_3), рассчитаны средние значения, стандартное отклонение и расчетная с учетом фактора разведения концентрация ПСА в исходном образце (табл. 3). Очевидно, что при последовательных 2-кратных разведениях образца исходной сыворотки «нулевым» стандартом из набора линейность определения сохраняется вплоть до кратности разведения в 1024 раза, при котором может быть выполнено адекватное определение концентрации ПСА в исходном образце до 30 000 нг/мл, что бывает необходимо при мониторинге эффективности консервативного лечения больных, страдающих диссеминированной аденокарциномой ПЖ.

Таблица 1. Результаты определения уровня общего простатспецифического антигена (ПСА) в одних и тех же образцах сыворотки крови (панель K50) с использованием диагностических наборов реагентов «ИммуноФА-ПСА» («НВО ИммуноТех», Россия) и «CanAg PSA total EIA» (CanAg Diagnostics, Швеция)

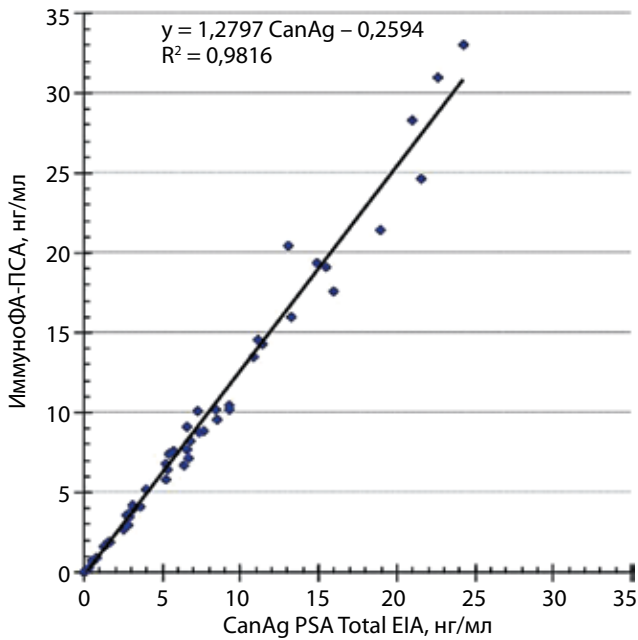
Образец	Определенный уровень ПСА, нг/мл		CanAg / ИммуноФА, %	Образец	Определенный уровень ПСА, нг/мл		CanAg / ИммуноФА, %
	ИммуноФА-ПСА	CanAg PSA total EIA			ИммуноФА-ПСА	CanAg PSA total EIA	
К-1	8,2	6,7	81,7	К-26	16,0	13,2	82,5
К-2	0,1	0,1	100,0	К-27	24,7	21,6	87,4
К-3	14,5	11,1	72,1	К-28	7,7	6,6	85,7
К-4	7,0	5,4	77,0	К-29	10,5	9,3	88,6
К-5	0,3	0,3	100,0	К-30	2,7	2,5	92,6
К-6	0,1	0,1	100,0	К-31	14,3	11,4	79,7
К-7	5,1	4,0	78,4	К-32	33,0	24,3	73,6
К-8	10,2	9,3	91,2	К-33	7,6	5,7	75,0
К-9	8,7	7,4	85,1	К-34	3,5	2,9	82,9
К-10	0,7	0,6	85,7	К-35	9,6	8,5	88,5
К-11	3,0	2,8	93,3	К-36	1,8	1,6	88,9
К-12	0,7	0,5	71,4	К-37	5,8	5,3	91,3
К-13	8,8	7,6	86,4	К-38	30,4	22,6	74,3
К-14	1,9	1,6	84,2	К-39	1,6	1,2	75,0
К-15	19,4	14,9	76,8	К-40	10,2	8,4	82,4
К-16	7,2	6,7	93,1	К-41	7,5	5,8	77,3
К-17	3,5	2,7	77,1	К-42	6,8	5,2	76,5
К-18	2,0	1,6	80,0	К-43	21,4	18,9	88,3
К-19	13,5	10,8	80,0	К-44	6,4	5,3	82,8
К-20	17,6	16,0	90,9	К-45	0,9	0,8	88,9
К-21	3,9	3,1	79,5	К-46	6,7	6,4	95,5
К-22	4,2	3,1	73,8	К-47	19,1	15,4	80,6
К-23	10,1	7,3	72,3	К-48	8,2	6,8	82,9
К-24	20,4	13,1	64,2	К-49	28,3	21,0	74,2
К-25	9,1	6,6	72,5	К-50	4,1	3,6	87,8

Использование серийных разведений образцов позволяет избежать получения ложноотрицательных результатов анализа, возникающих вследствие хук-эффекта, значительно увеличить диапазон определяемых концентраций аналита и, соответственно, расширить область применения диагностического ИФА-набора. Однако реализация такого подхода связана со значительным повышением материалоемкости и себестоимости анализа и требует выполнения ряда стандартизованных манипуляций по пробоподготовке образца на преаналитическом этапе исследования.

Нами разработан и апробирован общий алгоритм, позволяющий оптимизировать процедуры такого

рода исследований. Ниже кратко изложены его основные принципы.

Для выполнения серийных 2-кратных разведений исходного образца сыворотки необходимо предварительно приобрести у производителя ИФА-набора дополнительно «нулевой» стандарт, поскольку входящего в состав коммерческого набора его количества (3 мл) недостаточно для выполнения систематических исследований. Серийные разведения образца удобно выполнять в дополнительно приобретаемом круглодонном 96-луночном планшете, последовательно перенося разводимый образец из лунки в лунку в вертикальных рядах (рис. 3). Предварительно



R^2 – величина достоверности аппроксимации

Рис. 1. Использование набора реагентов «ИммуноФА-ПСА». Значения концентрации общего простатспецифического антигена в образцах сыворотки крови во всем диапазоне калибровочной кривой превышают аналогичные значения, определенные с использованием набора «CanAg PSA total EIA» в среднем на 28 %, однако достоверно аппроксимируются с ними прямой линией, что свидетельствует о высоком коэффициенте корреляции между 2 методами

в лунки планшета, используемые для разведения образца, следует поместить по 50 мкл «нулевого» стандарта, применяя только калиброванную одноразовую пипетку. Далее в лунку А соответствующего вертикального ряда следует внести 50 мкл исходной сыворотки, подлежащей разведению и дальнейшему исследованию. Не меняя наконечник пипетки, следует перемешать содержимое лунки пипетированием, после чего перенести 50 мкл ее содержимого в лунку В того же ряда, и так далее до лунки G, в которой в результате окажется разведенный в 128 раз образец.

Если в мониторинг включают пациента, ожидаемый уровень ПСА у которого на «скрининговом» визите неизвестен, для ИФА используют разведения, полученные в лунках А, С, Е и G (на рис. 3 выделены

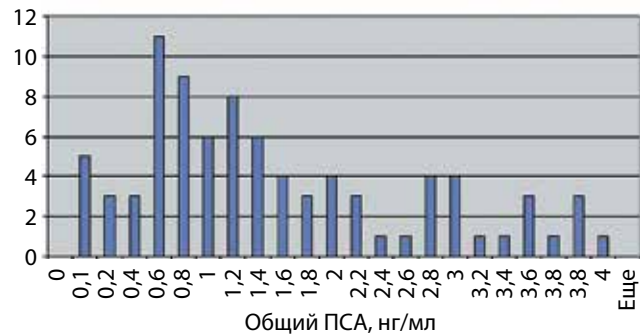


Рис. 2. Использование ИФА-набора «ИммуноФА-ПСА». Распределение вероятностей определения уровня общего ПСА в сыворотке крови практически здоровых лиц мужского пола в возрасте 18–69 лет

жирным шрифтом), соответствующие разведениям в 2, 8, 32 и 128 раз; иммуноферментная реакция выполняется в дубляж; для анализа образца 1 пациента используют 1 полный стрип (8 лунок) планшета ИФА-набора. Если в результате реакции для разведений в 128 раз концентрация ПСА превышает диапазон определяемых значений, следует повторить разведения исходного образца для получения разведений в 256, 512 и 1024 раза, после чего тестировать полученные разведения в ИФА. Если в результате ИФА в области определяемых концентраций аналита окажутся сразу несколько последовательных разведений сыворотки данного пациента, для дальнейших расчетов исходной концентрации ПСА следует использовать наименьшее из них.

Если пациент уже находится в повизитном мониторинге и базальный уровень его ПСА известен (документирован и внесен в базу данных), при последующих визитах в качестве ожидаемого следует использовать то же разведение исходной сыворотки, которое при предыдущем визите использовалось для расчета исходной концентрации ПСА. Однако динамика развития опухолевого процесса может приводить к заметным колебаниям концентрации аналита в сыворотке крови, в связи с чем следует также анализировать одно разведение до ожидаемого и 2 последовательных разведения после него. Для этого следует произвести серийные разведения исходной сыворотки аналогично тому, как это описано выше,

Таблица 2. Воспроизводимость результатов определения простатспецифического антигена в 4 аналитических сессиях

Образец	Исх. знач., нг/мл	1-я сессия (n = 10)			2-я сессия (n = 10)			3-я сессия (n = 10)			4-я сессия (n = 10)		
		X_{cp}	SD	CV %	X_{cp}	SD	CV, %	X_{cp}	SD	CV, %	X_{cp}	SD	CV, %
К-18	2,0	1,97	0,18	9,14	1,99	0,25	12,56	2,13	0,19	8,92	1,92	0,21	10,94
К-4	7,0	7,03	0,21	2,99	7,02	0,20	2,85	7,03	0,18	2,56	7,05	0,22	3,12
К-38	30,4	30,72	0,78	2,54	30,06	0,77	2,56	29,33	0,94	3,20	30,06	0,93	3,09

Примечание. X_{cp} – среднее арифметическое, нг/мл; SD – стандартное отклонение среднего арифметического, нг/мл; CV – коэффициент вариации.

Таблица 3. Определенные и расчетные значения концентрации общего простатспецифического антигена (ПСА) при серийных последовательных разведениях контрольного материала LyrphoChek Level 3 и образцов сыворотки крови (3 пациента с верифицированным диагнозом аденокарциномы предстательной железы)

Образец	Фактор разведения, раз	Определенная концентрация ПСА, нг/мл				Стандартное отклонение	Расчетная концентрация ПСА в исходном образце, нг/мл
		n1	n2	n3	Среднее		
LyrphoChek Level 3	—	31,9	32,5	32,2	32,2	0,30	32,2
	2	16,9	16,8	16,4	16,7	0,26	33,4
	4	8,3	8,6	8,5	8,47	0,15	33,9
	8	4,4	4,2	4,7	4,43	0,25	35,4
	16	2,5	2,2	2,3	2,33	0,15	37,3
	32	1,2	1,1	1,4	1,23	0,15	39,4
	64	0,6	0,5	0,6	0,57	0,06	36,5
	Среднее стандартное отклонение						
ACP-24	—	>>	>>	>>	—	—	—
	2	32,2	33,6	33,1	32,97	0,71	66,0
	4	16,6	16,9	16,4	16,63	0,25	66,5
	8	8,4	8,2	8,8	8,47	0,31	67,8
	16	4,5	4,2	4,6	4,43	0,21	70,9
	32	2,1	2,2	2,4	2,23	0,15	71,4
	64	1,1	0,9	1,2	1,07	0,15	68,5
	128	0,6	0,4	0,6	0,53	0,12	67,8
Среднее стандартное отклонение							68,4 2,06
ACP-31	—	>>	>>	>>	—	—	—
	2	>>	>>	>>	—	—	—
	4	>>	>>	>>	—	—	—
	8	28,8	26,7	28,4	27,97	1,12	223,8
	16	15,1	13,7	14,1	14,3	0,75	228,8
	32	7,8	6,9	6,7	7,13	0,59	228,2
	64	4,0	3,8	3,6	3,80	0,20	243,2
	128	1,8	1,8	1,9	1,83	0,06	234,2
256	0,8	0,9	0,9	0,87	0,06	222,7	
Среднее стандартное отклонение							230,15 7,59
ACP-46	—	>>	>>	>>	—	—	—
	2	>>	>>	>>	—	—	—
	4	>>	>>	>>	—	—	—
	8	>>	>>	>>	—	—	—
	16	>>	>>	>>	—	—	—
	32	25,5	26,8	26,1	26,13	0,65	836,2
	64	13,2	13,0	13,2	13,13	0,12	840,3
	128	6,8	6,1	6,4	6,43	0,35	823,0
	256	3,2	3,3	3,3	3,27	0,06	826,9
	512	1,5	1,5	1,7	1,57	0,12	803,8
1024	0,8	0,7	0,9	0,80	0,10	819,2	
Среднее стандартное отклонение							824,9 13,04

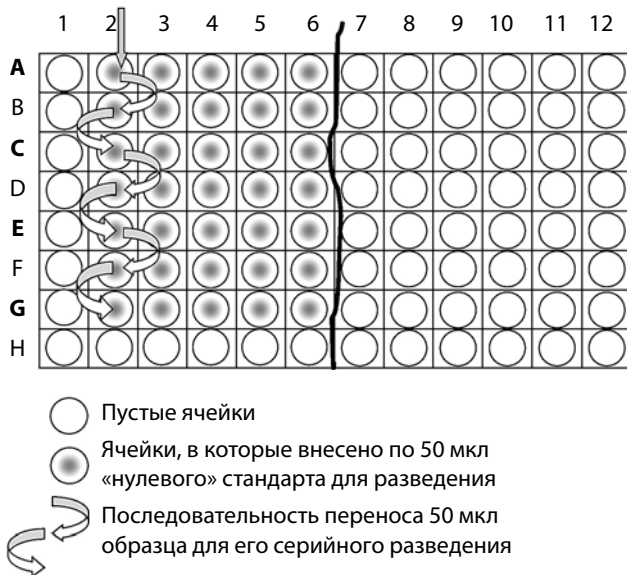


Рис. 3. Серийные двукратные разведения образца сыворотки крови для последующего ИФА концентрации ПСА у больных, страдающих диссеминированной аденокарциномой ПЖ. Дизайн выполнения

но анализировать разведения, полученные в 4 последовательных лунках (например, лунки В, С, D и E, если при предыдущем визите расчет сделан из разведения в лунке С). Использование 4 последовательных разведений также потребует использования 1 целого стрипа (8 лунок) планшета ИФА-набора. Таким образом, для целей мониторинга уровня ПСА у пациентов, страдающих диссеминированной аденокарциномой ПЖ, максимально на 1 планшете может быть выполнен ИФА 11 образцов сыворотки при постановке реакции в дублях и построении калибровочной кривой для каждого планшета, чего требуют автоматические ИФА-анализаторы.

Используя разработанный алгоритм преаналитической пробоподготовки образцов сыворотки крови, мы провели исследования по повизитному мониторингу больных диссеминированной аденокарциномой ПЖ, проходивших лечение и находившихся под клиническим наблюдением в различных медицинских учреждениях г. Москвы. Повторные визиты соответствовали интервалу времени примерно в 1 мес (табл. 4). Поскольку задачей являлось исключительно лабораторное сопровождение медицинских лечебных мероприятий, никакой оценки соответствия уровня ПСА клинической картине заболевания и эффективности проводимого лечения в настоящей работе не может быть проведено. Вместе с тем приведенные данные иллюстрируют общую динамику процесса и диапазоны концентраций, в которых могут

Таблица 4. Уровень общего простатспецифического антигена в сыворотке крови при повизитном мониторинге больных диссеминированной аденокарциномой предстательной железы, определенный в стандартном иммуноферментном анализе после выполнения серийных разведений образцов по разработанному алгоритму (рассчитан с учетом фактора разведения)

Визит	Уровень простатспецифического антигена, нг/мл					
	МАСР-3	МАСР-7	МАСР-8	МАСР-11	МАСР-16	МАСР-23
Скрининг	339	1554	2513	9603	3019	1165
Визит 1	244	225	2057	3642	6013	1254
Визит 2	567	151	2001	683	5214	256
Визит 3	243	16	803	93	10535	16
Визит 4	487	98	256	22	—	7,2
Визит 5	247	252	215	11	—	9,3
Визит 6	248	549	170	6,5	—	5,4
Визит 7	385	970	107	6,2	—	7,7
Визит 8	353	—	111	5,6	—	5,0
Визит 9	519	—	108	3,8	—	3,9
Визит 10	558	—	47	2,8	—	2,1
Визит 11	—	—	57	2,7	—	0,2
Визит 12	—	—	117	1,5	—	0,7
Визит 13	—	—	640	2,1	—	0,5
Визит 14	—	—	—	7,3	—	0,3
Визит 15	—	—	—	93	—	0,7

Примечание. МАСР-3, МАСР-7, МАСР-8, МАСР-11, МАСР-16, МАСР-23 – коды пациентов.

колебаться уровни ПСА при повизитном мониторинге больных, а также показывают потенциальную пригодность серийных производящихся диагностических наборов реагентов для количественного определения оПСА человека методом ИФА для подобных исследований.

Таким образом, применение общих принципов разработанного алгоритма количественного определения оПСА в сыворотке крови человека методом ИФА предоставляет возможность использования стандартных диагностических ИФА-наборов одновременно для первичной лабораторной диагностики, скрининга и систематического мониторинга состояния больных с верифицированным диагнозом аденокарциномы ПЖ.

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

1. Пушкарь Д. Ю. Радикальная простатэктомия. М., 2004.
2. Пушкарь Д. Ю., Раснер П. И. Диагностика и лечение локализованного рака предстательной железы. М., 2008.
3. Урология. Национальное руководство. Под ред. Н. А. Лопаткина. М., 2011.
4. Клиническая андрология. Под ред. В.-Б. Шилла, Ф. Комхаира, Т. Харгрива. М., 2011.
5. Попова Н. А., Калаева Л. А., Одинцов С. В. и др. Сравнительный анализ общего простатспецифического антигена с помощью четырех различных наборов реагентов. Инф. бюллетень «Новости «Вектор-Бест» 2008;1(47):3–4. <http://www.vector-best.ru/publ/nvb/n47.pdf>.
6. Шаркова В. Е., Власов Г. С., Свежова Н. В. Ошибки при проведении иммуноферментного анализа. Клиническая лабораторная диагностика 2007;3:42–5.
7. Осипова Т. В., Ленева Н. В., Виха Г. В. и др. Набор для количественного определения общего простатспецифического антигена в сыворотке крови человека методом одностадийного твердофазного иммуноферментного анализа. Патент РФ № 2242006 от 10.12.2004.

РЕФРАКТЕРНОЕ ТЕЧЕНИЕ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМЫ И КОРОТКИЕ СРОКИ ЖИЗНИ БОЛЬНЫХ В ЭРУ ПРЕПАРАТОВ НАПРАВЛЕННОГО ДЕЙСТВИЯ. В ЧЕМ ПРИЧИНА?

Н.А. Фалалеева

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Наталья Александровна Фалалеева falaleeva-n@mail.ru

Введение. Разработанные специально для фолликулярной лимфомы (ФЛ) прогностические индексы FLIPI (Follicular Lymphoma International Prognostic Index) и FLIPI-2 недостаточно отражают вариабельность течения заболевания и не в полной мере характеризуют его прогноз. На сегодняшний день опубликованы многочисленные результаты поиска новых прогностических факторов, позволяющих более точно предсказывать прогноз ФЛ уже на этапе первого обращения больного. Это диктует необходимость поиска новых прогностических факторов оценки прогноза у больных в ранние и поздние сроки наблюдения и лечения.

Цель исследования – сравнительный анализ частоты встречаемости ряда клинических и лабораторных характеристик в дебюте ФЛ для определения факторов, негативно влияющих на исход заболевания.

Материалы и методы. В настоящем исследовании у 79 (36 %) из 222 больных ФЛ течение заболевания характеризовалось как агрессивное (1-я группа), часть больных погибла на фоне прогрессирования ФЛ в сроки менее чем 3 года от момента постановки диагноза, у остальных наблюдалось развитие ранних рецидивов/прогрессирования в сроки менее чем 24 мес от начала противоопухолевого лечения. Для определения факторов, негативно повлиявших на исход заболевания, проводили сравнение частоты встречаемости ряда клинических и лабораторных характеристик в дебюте ФЛ в исследуемой и группе сравнения ($n = 143$).

Результаты. Было установлено, что в 1-й группе больные имели достоверно худшую оценку по шкале ECOG, достоверно чаще наблюдалось снижение уровня общего белка сыворотки крови, а также гемоглобина < 120 г/л, заболевание более часто сопровождалось симптомами интоксикации, на момент диагностики ФЛ у значительного числа больных выявлялось поражение более 1 экстранодального органа, достоверно чаще диагностировали поражение селезенки, качество ответа на противолимфомную терапию 1-й линии было достоверно хуже, в соответствии с критериями FLIPI почти половина больных была отнесена к группе высокого риска. Изучено прогностическое значение факторов, не вошедших в существующие прогностические модели. Достоверно отрицательное влияние на общую выживаемость (ОВ) и выживаемость без прогрессирования (ВБП) оказывают снижение уровня общего белка сыворотки крови (для ОВ $p = 0,03$, для ВБП $p = 0,021$), поражение селезенки (для ОВ $p = 0,000$, для ВБП $p = 0,002$) и неудовлетворительный ответ на противолимфомную терапию 1-й линии – стабилизация опухоли или ее прогрессирование (для ОВ $p = 0,000$, для ВБП $p = 0,000$). Наличие симптомов интоксикации достоверно ухудшает показатели ОВ ($p = 0,000$) и не влияет на ВБП ($p = 0,127$).

Заключение. Помимо стандартных факторов прогноза ФЛ существуют признаки, не включенные в прогностические индексы FLIPI. При оценке ОВ и ВБП нами установлена неблагоприятная прогностическая роль снижения уровня общего белка сыворотки крови, поражения селезенки и неудовлетворительного ответа на противолимфомную терапию 1-й линии (стабилизация опухоли или ее прогрессия). Наличие симптомов интоксикации достоверно ухудшало показатели ОВ, но не влияло на ВБП. Перечисленные признаки целесообразно использовать в выборе лечебной тактики при анализе риска прогрессирования у больных ФЛ.

Ключевые слова: фолликулярная лимфома, прогноз, общий белок сыворотки крови

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-79-86

REFRACTORY FOLLICULAR LYMPHOMA AND SHORT-TERM PATIENTS SURVIVAL IN THE ERA OF TARGETED TREATMENT. WHAT IS THE REASON?

N.A. Falaleeva

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Introduction. Prognostical indexes for follicular lymphoma (FLIPI, FLIPI-2 (Follicular Lymphoma International Prognostic Index)) not completely reflect the variability of disease and its prognosis. There appeared new data concerning the prognostic factors which can predict the disease behaviour more thoroughly. Search for new prognostic factors which can predict both immediate and late progression risk in follicular lymphoma is one of the most important tasks in oncohaematology.

Objective. To compare the frequencies of clinical and laboratory characteristics at diagnosis which negatively influenced the prognosis of follicular lymphoma was the purpose of this research.

Materials and methods. From 222 patients with follicular lymphoma we have identified 79 (36 %) aggressive course of the disease (1st group): some patients died from follicular lymphoma progression during less than 3 years from diagnosis, in others – early relapses/progression took place in less than 24 months from start of treatment. We compared the frequencies of clinical and laboratory characteristics at diagnosis which negatively influenced the prognosis of follicular lymphoma in patients of 1st group with 143 patients of control (standard prognosis) group. 2 groups of follicular lymphoma patients were compared: 1st group – 79 patients with unfavourable prognosis and 2nd group – 143 patients with favourable prognosis.

Results. Patients from the 1st group compared to the 2nd group had worse estimation according to ECOG, more frequent diminution of serum protein, more frequent Hb lower than 120 g/l, more frequent intoxication symptoms at diagnostics, more frequent involvement of more than 1 extranodal organ, more frequent involvement of spleen, worse treatment response, higher proportion of high risk according to FLIPI. New prognostic factors not included into existing prognostic models were identified. Negative prognostic factors for overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) were diminution of serum protein level (OS $p = 0,03$; PFS $p = 0,021$), involvement of spleen (OS $p = 0,000$, PFS $p = 0,002$) and bad response (stabilization, progression) to 1st line therapy (OS $p = 0,000$, PFS $p = 0,000$). Symptoms of intoxication negatively influenced OS ($p = 0,000$), but not PFS ($p = 0,0127$).

Conclusion. Except of standard prognostic factors, several other factors can negatively influence the prognosis of follicular lymphoma: diminution of total serum protein, involvement of spleen, unsatisfactory response to 1st line treatment (stabilization, progression), intoxication symptoms. These parameters are necessary to estimate and use for more thorough estimation of progression risk in follicular lymphoma.

Key words: follicular lymphoma, prognosis, total serum protein level

Введение

Фолликулярная лимфома (ФЛ) – 2-я по частоте среди всех неходжкинских лимфом взрослых [1]. Этот иммуноморфологический вариант опухоли подтверждается у 22 % пациентов, страдающих лимфопротеративными заболеваниями [2].

Открытие в 1990-х годах моноклональных антител, специфичных к опухолевым клеткам, затем конъюгированных радиоиммунопрепаратов и наконец таргетных ингибиторов сигнальных молекул благоприятно повлияло на судьбы большинства больных ФЛ, значительно улучшая показатели выживаемости без прогрессирования (ВБП) и, по данным ряда авторов, некоторые показатели общей выживаемости (ОВ) [3–5]. Однако ФЛ по-прежнему остается неизлечимым заболеванием с медианой продолжительности жизни пациентов в среднем 7–10 лет [6].

ФЛ – индолентная лимфома (такие лимфомы обычно характеризуются длительным и относительно благоприятным течением), однако в 10–15 % наблюдений отмечаются быстрое прогрессирование и рефрактерное течение заболевания с гибелью больных в течение 1,5–2 лет после постановки диагноза [7]. Еще приблизительно у 20 % больных ФЛ опухоль рецидивирует в сроки менее 2 лет после начала терапии 1-й линии [4, 8, 9], причем половина этих больных рискует погибнуть в течение 5 лет от момента подтверждения диагноза ФЛ [1]. Таким образом, приблизительно у 35 % больных ФЛ отмечено не индолентное, а агрессивное течение заболевания.

Разнообразие клинического течения и ответа на терапию ФЛ стало причиной создания прогностических моделей: необходимо еще до начала лечения определить больных с ожидаемым неблагоприятным

исходом ФЛ. В настоящее время в клинической практике применяются 2 прогностические модели – FLIPI (Follicular Lymphoma International Prognostic Index) и FLIPI-2.

Прогностическую модель FLIPI клиницисты используют с 2004 г. FLIPI представляет собой совокупность некоторых исходных клинических и лабораторных параметров, каждый из которых в отдельности является независимым прогностическим фактором. К ним отнесены:

- возраст старше 60 лет,
- уровень гемоглобина крови < 120 г/л,
- повышение уровня лактатдегидрогеназы,
- III–IV стадии заболевания в соответствии с классификацией Ann Arbor,
- наличие более 4 зон специфического нодального поражения [10].

Эти 5 исходных признаков составили основу международного прогностического индекса ФЛ FLIPI. Группы риска раннего прогрессирования сформированы в зависимости от количества исходных неблагоприятных факторов прогноза: низкий риск – 0–1 фактор, промежуточный риск – 2 фактора, высокий риск – 3 фактора и более.

Ожидаемые сроки жизни больных в различных прогностических группах, выделенных в соответствии с критериями FLIPI, достоверно различаются.

Второй прогностической моделью является FLIPI-2. В соответствии с этой системой факторами прогноза, влияющими на отдаленные результаты лечения, являются:

- возраст старше 60 лет,
- поражение костного мозга,
- уровень гемоглобина крови < 120 г/л,

- уровень β 2-микроглобулина выше нормы,
- максимальные измеряемые размеры пораженного лимфатического узла более 6 см [11].

Прогрессивными в этой модели стали исключение стадии распространения лимфомы как фактора, влияющего на прогноз, и выбор лечебной тактики [9].

Однако разработанные специально для ФЛ FLIPI и FLIPI-2 недостаточно отражают вариабельность течения заболевания и не в полной мере характеризуют его прогноз. На сегодняшний день опубликованы многочисленные результаты поиска новых прогностических факторов, позволяющих более точно предсказывать прогноз ФЛ уже на этапе первого обращения больного.

Авторы одних исследований считают неудачи лечения следствием серьезных генетических поломок в клетках лимфомы [12]. В настоящее время проводится детальное изучение клеток микроокружения – определение профилей генной экспрессии – показатель, характеризующий уровни инфильтрации опухоли Т-лимфоцитами и макрофагами [13]. Однако ни одна из этих методик широкого применения в повседневной практике пока не нашла.

Другие исследователи обнаруживают достоверную корреляцию между прогнозом ФЛ и такими параметрами, как:

- II–III цитологический тип опухоли,
- скорость оседания эритроцитов,
- снижение уровня альбумина,
- оценка состояния больного по шкале ECOG.

Наличие любого из этих признаков – дополнительный фактор плохого прогноза у больных ФЛ группы высокого риска по шкалам FLIPI и FLIPI-2 [14].

Предметом обсуждения V. Prochazka и соавт. явилась прогностическая значимость качества достигнутого ответа на лечение (полнота ремиссии). Исследователи считают необходимым определение МОБ – транскрипта Vcl-2/IgH в костном мозге после завершения лечения, а также использование позитронно-эмиссионной томографии всего тела в эти же сроки. В случае положительных результатов вероятность развития раннего рецидива велика, причем независимо от того, проводится поддерживающая терапия ритуксимабом или нет [15].

В настоящем исследовании из 222 больных у 79 (36 %) течение заболевания характеризовалось как агрессивное. Часть больных погибла на фоне прогрессирования ФЛ в сроки менее чем 3 года от момента постановки диагноза, у остальных наблюдалось развитие ранних рецидивов или прогрессирование в срок менее 24 мес от начала противолимфомного лечения.

Цель исследования – сравнительный анализ частоты встречаемости ряда клинических и лабораторных характеристик в дебюте ФЛ для определения факторов, негативно влияющих на исход заболевания.

Материалы и методы

Работа выполнена в НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все 222 больных проходили обследование, лечение и наблюдение в отделении химиотерапии гемобластозов НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Проведен сравнительный анализ частоты некоторых клинических и лабораторных характеристик, а также результатов лечения больных ФЛ 2 групп: в 1-ю группу вошли 79 больных, у которых течение заболевания характеризовалось как агрессивное, во 2-ю (группа сравнения) – 143 с индолентным (благоприятным) течением ФЛ.

Морфологическая диагностика ФЛ проведена в отделе патологической анатомии опухолей человека по результатам гистологического исследования опухолевой ткани. Для установления иммуноморфологического варианта лимфомы применяли иммуногистохимическое (иммуноферментное) окрашивание биоптата опухоли по парафиновым блокам в отделе патологической анатомии опухолей человека и/или иммунофенотипирование клеток экстрамедуллярной опухоли методом иммунофлуоресцентного окрашивания свежемороженых (криостатных) срезов в лаборатории иммунологии гемопоэза НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Во всех случаях диагноз ФЛ устанавливали в соответствии с критериями классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей ВОЗ 2008 г. [16].

С целью определения факторов, отрицательно влияющих на сроки жизни больных и длительность противоопухолевого ответа, нами были проанализированы различные клинические и лабораторные параметры и дана сравнительная характеристика ФЛ обеих групп.

Всем больным проведено общеклиническое обследование, включающее все современные общепринятые методы диагностики онкогематологических заболеваний.

Для установления степени распространения опухолевого процесса использована классификация, принятая в Ann Arbor (1971).

Анализ непосредственных результатов терапии проведен с учетом международных стандартизованных критериев ответа на лечение при неходжкинских лимфомах [17].

Статистический анализ ОВ и ВБП больных проводился по методике Каплана – Майера. Непараметрические данные сравнивались с помощью таблиц сопряженности признаков по критерию χ^2 Пирсона. Статистическая обработка результатов исследования проведена с использованием программы SPSS Statistics 22.0 for Windows.

Результаты и обсуждение

В настоящем исследовании у всех 222 больных диагноз ФЛ был установлен впервые. Больные оставались под наблюдением в сроки от 4 до 216 мес, среднее значение – 64 мес, медиана времени наблюдения не достигнута. В 1-й группе (неблагоприятного прогноза) сроки жизни 31 (14 %) больного не превышали 36 мес от момента постановки диагноза, у остальных 48 (22 %) в сроки менее 24 мес от начала противопролиферативного лечения наблюдалось развитие ранних рецидивов или прогрессирование.

Возраст больных 1-й группы варьировал от 27 до 85 лет при среднем значении 58 лет, во 2-й группе среднее значение возраста равнялось 54,5 года с разбросом от 23 до 84 лет. Число больных старше 60 лет в 2 исследуемых группах достоверно не различалось ($p = 0,079$). Соотношение мужчин и женщин также было сопоставимым, с некоторым преобладанием женщин в обеих группах ($p = 0,476$).

При анализе иммуногистохимических характеристик экстрамедуллярной опухолевой ткани достоверных различий не выявлено. В обеих группах все 3 цитологических типа ФЛ присутствовали в равных пропорциях: 1-й цитологический тип – 35,5 и 32,1 %, 2-й – 54 и 52,6 %, 3-й – 10,5 и 14,6 % ($p = 0,715$) в 1-й и 2-й группах соответственно.

Не отмечено различий при анализе уровня пролиферативной активности опухоли – Ki67. Количество случаев с высоким (> 30 %) уровнем этого маркера достоверно не различалось ($p = 0,978$).

При анализе иммунологических параметров опухолевых клеток в анализируемых группах частота экспрессии CD10, активационного антигена CD23 и CD21, сопоставима ($p = 0,119; 0,230; 0,352$ соответственно).

Согласно критериям FLPI 3 фактора и более неблагоприятного прогноза определялись у 46,8 % ($n = 37$) больных 1-й группы и у 28,7 % ($n = 41$) 2-й группы. Обратное соотношение обнаруживалось в группе благоприятного прогноза по FLPI – наличие 0–1 фактора наблюдалось с частотой 26,6 и 38,5 % соответственно. Признаки достоверно взаимосвязаны ($p = 0,023$).

Распределение больных по стадиям в 2 группах достоверно не различалось. У большинства на момент постановки диагноза выявлены распространенные – III и IV стадии заболевания: 77,2 и 67,8 % ($p = 0,139$).

При анализе общего состояния больных по шкале ECOG перед началом противопролиферативной терапии 1-й линии 46,8 % больных 1-й группы имели значительные соматические нарушения; во 2-й группе больные с неудовлетворительным общим статусом составляли 23,8 %. Взаимосвязь высокодостоверна ($p = 0,000$).

Симптомы интоксикации, связанные с ФЛ, наблюдались у 35,4 % больных 1-й группы и лишь у 19,6 % больных 2-й ($p = 0,009$).

Нами проанализирован ряд лабораторных параметров у больных ФЛ обеих групп. Уровень ЛДГ оказался повышенным в дебюте заболевания у 34,3 % больных 1-й группы, во 2-й группе доля больных с уровнем ЛДГ > 450 Ед/л, оказалась меньшей – 22,4 % ($p = 0,057$).

При анализе прочих биохимических показателей наше внимание привлекло достоверно более частое снижение уровня общего белка сыворотки крови в группе больных неблагоприятного прогноза – 21,6 % против 7,9 % ($p = 0,014$). При анализе гемограмм больных выявлено достоверно более частое снижение уровня гемоглобина < 120 г/л у больных 1-й группы ($p = 0,001$).

Мы сопоставили прочие показатели гемограмм больных и достоверных различий между группами не выявили, в том числе при изучении количества лимфоцитов, частота случаев повышения уровня лимфоцитов крови сопоставима – 7,2 и 7,4 %. Примечательно, что по данным миелограмм повышение уровня лимфоцитов костного мозга было несколько выше у больных 2-й группы (50,4 % против 41 %). При этом поражение костного мозга по данным морфологического исследования трепанобиоптатов из подвздошных костей отмечали с несколько большей частотой в 1-й группе – 44,9 % ($n = 35$) против 32,9 % ($n = 47$) ($p = 0,077$).

Процент больных ФЛ, у которых при обследовании в дебюте заболевания обнаружено опухолевое поражение лимфатических узлов в 4 зонах и более, достоверно не различался (58,2 % – в 1-й группе и 49,0 % – во 2-й, $p = 0,185$). Также не выявлено никаких различий в частоте встречаемости различных локализаций лимфатических узлов (периферические, средостенные, внутрибрюшинные, забрюшинные). Опухолевые образования размерами > 6 см одинаково часто наблюдали в обеих группах – 51,9 и 49,0 % ($p = 0,185$).

Проанализирован и другой параметр, отражающий распространенность опухолевого процесса, – поражение 2 экстранодальных органов и более. Такие клинические ситуации наблюдали достоверно чаще в 1-й группе больных – 40,5 % против 24,5 % во 2-й группе ($p = 0,013$). Из экстранодальных органов лимфатической системы в 1-й группе достоверно чаще встречалось поражение селезенки – 34,2 % против 17,5 % ($p = 0,005$). Различий в частоте поражения других экстранодальных органов не отмечено.

Мы изучили также непосредственные результаты противопролиферативной терапии ФЛ 1-й линии в сопоставляемых группах. Терапевтические подходы и методы лечения, предложенные больным ФЛ, были сопоставимы. Лечение оказалось успешным, достигнуты полные или частичные ремиссии у 84,5 % ($n = 109$) больных 2-й группы и лишь у 53,1 % ($n = 42$) больных

1-й группы. Полные ремиссии достигнуты достоверно чаще во 2-й группе – 62,6 % против 27,8 % ($p = 0,000$). Стабилизация опухоли, прогрессирование во время лечения или сразу после его окончания достоверно чаще наблюдались у больных 1-й группы – 46,9 % против 15,1 % ($p = 0,000$).

Большинство обозначенных выше факторов входят в состав используемых в настоящее время прогностических моделей: высокая оценка по шкале ECOG является фактором неблагоприятного прогноза согласно IPI (International Prognostic Index), уровень гемоглобина крови < 120 г/л – в соответствии с FLIPI и FLIPI-2, повышение уровня ЛДГ – согласно IPI и FLIPI, наличие более 1 экстранодального поражения – согласно IPI.

Прогностическое влияние факторов, не входящих в традиционные системы прогноза (наличие симптомов интоксикации, снижение уровня общего белка сыворотки крови, поражение селезенки, степень ответа на противолимфому терапию 1-й линии), изучено в настоящем исследовании.

Симптомы интоксикации

Нами проанализировано влияние этого фактора на отдаленные результаты лечения и сроки жизни больных. Прогностическая ценность фактора изучена во всей группе больных ФЛ, включенных в настоящее исследование ($n = 222$). При анализе кривых ОБ выявлено неблагоприятное влияние наличия симптомов интоксикации, связанных с опухолью, на результаты лечения (рис. 1). Однако этот фактор достоверно не влияет на ВБП ($p = 0,127$).

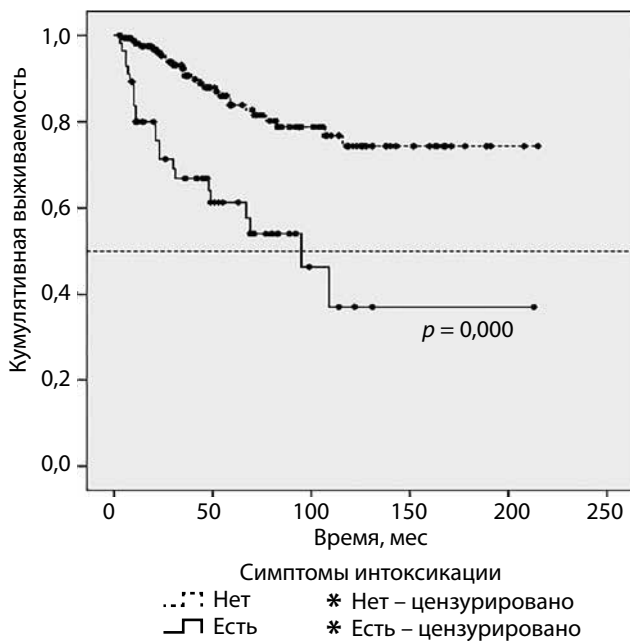


Рис. 1. Зависимость общей выживаемости больных фолликулярной лимфомой от наличия симптомов интоксикации

Снижение уровня общего белка сыворотки крови
 При анализе кривых ОБ и ВБП в зависимости от уровня общего белка сыворотки крови выявлено достоверно отрицательное прогностическое влияние снижения показателя на сроки жизни больных и продолжительность противоопухолевого ответа (рис. 2, 3).

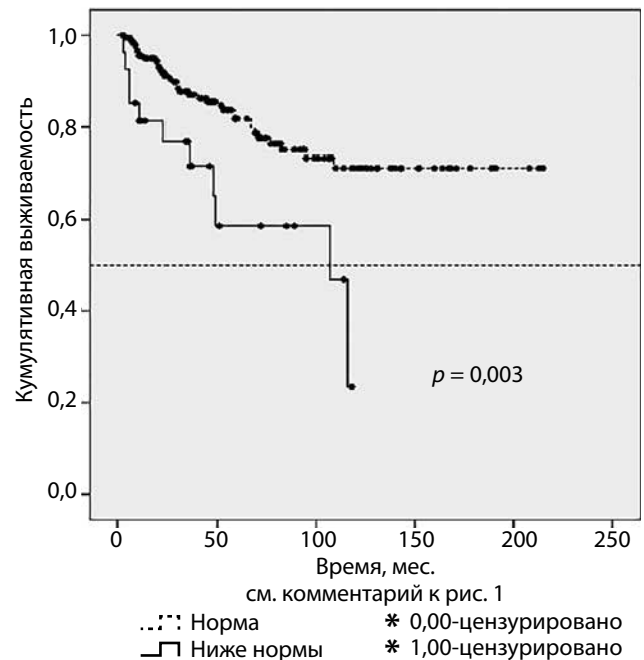


Рис. 2. Общая выживаемость больных ФЛ в зависимости от уровня общего белка сыворотки крови

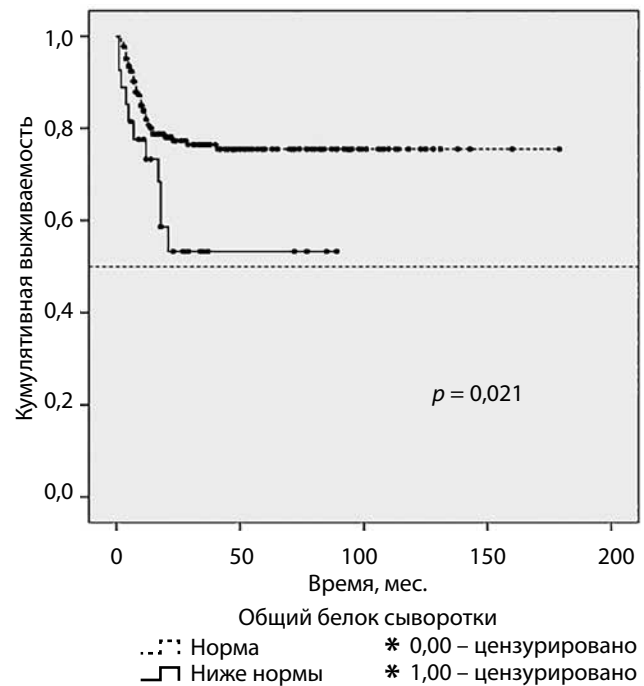


Рис. 3. Выживаемость без прогрессирования заболевания у больных фолликулярной лимфомой в зависимости от уровня общего белка сыворотки крови

Поражение селезенки

Поражение селезенки в дебюте ФЛ является самостоятельным высокодостоверным прогностическим фактором, негативно влияющим на отдаленные результаты лечения (рис. 4, 5).

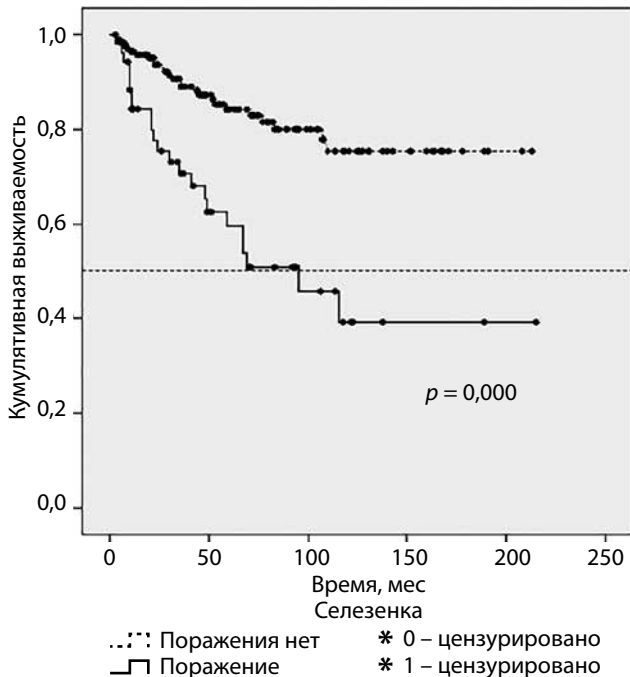


Рис. 4. Общая выживаемость больных фолликулярной лимфомой в зависимости от наличия поражения селезенки

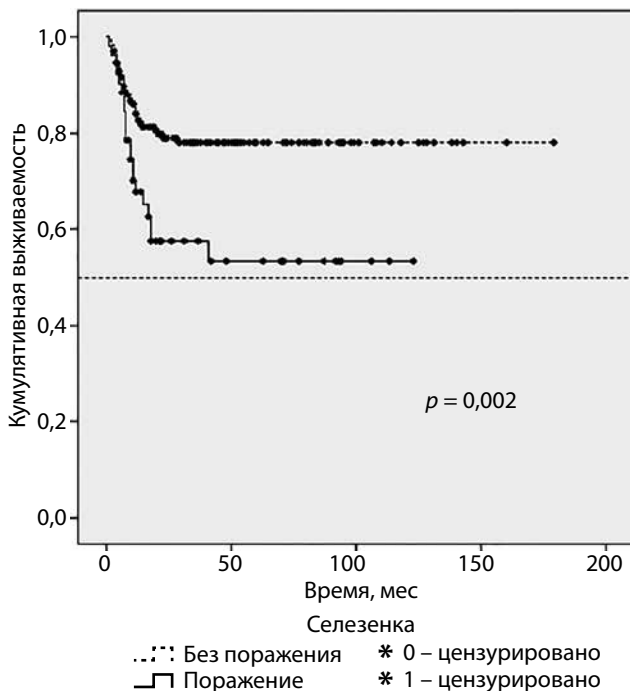


Рис. 5. Выживаемость без прогрессирования заболевания у больных фолликулярной лимфомой в зависимости от наличия поражения селезенки

Непосредственные результаты лечения

Среди клиницистов бытует мнение о том, что продолжительность жизни больных ФЛ в некоторой степени не зависит от ответа на противоопухолевое лечение. Мы проанализировали ожидаемые сроки жизни больных в зависимости от глубины и качества ответа на противолимфому терапию 1-й линии. При анализе кривых ОВ достоверно показано отрицательное влияние стабилизации опухоли, ее прогрессии на фоне лечения или сразу после его завершения. Кроме того, обращает на себя внимание тот факт, что больные, у которых противоопухолевый эффект соответствовал критериям частичной ремиссии, имеют худшие показатели ОВ по сравнению с больными, у которых была достигнута полная ремиссия (рис. 6). Та же тенденция прослеживается и при анализе кривых, отражающих показатели ВВП (рис. 7).

Заключение

В представленном исследовании проанализированы данные больных ФЛ, у которых течение индолентной опухоли характеризовалось как агрессивное, быстро рецидивирующее, с неудовлетворительными показателями ОВ. Для определения факторов, ухудшающих исход заболевания у этих пациентов, проведено сравнение частоты встречаемости ряда клинических и лабораторных характеристик, определенных

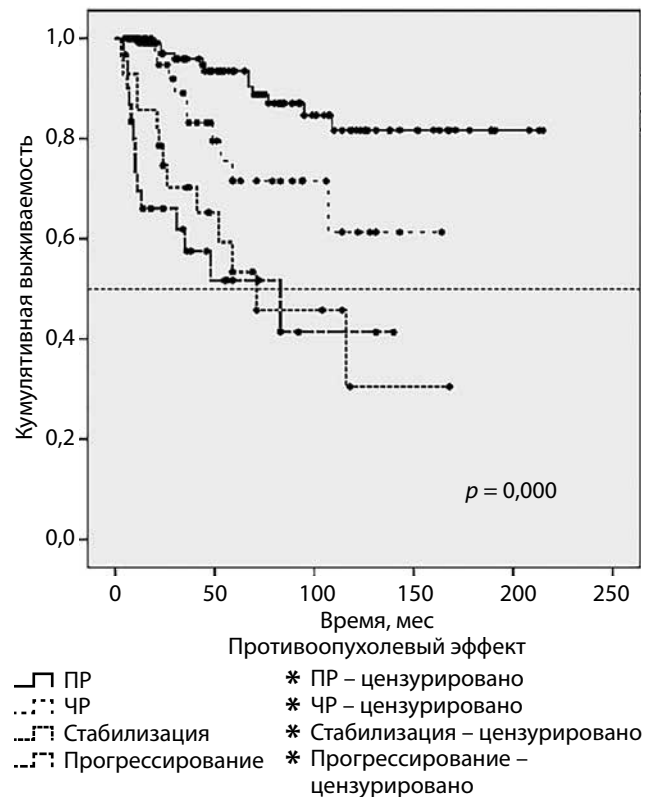


Рис. 6. Общая выживаемость больных фолликулярной лимфомой в зависимости от ответа на противолимфому терапию 1-й линии

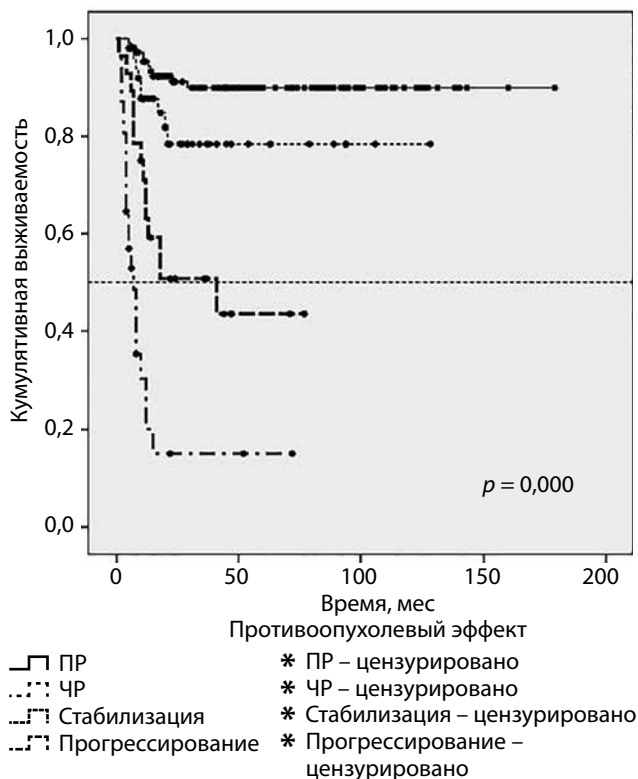


Рис. 7. Выживаемость без прогрессирования заболевания у больных фолликулярной лимфомой в зависимости от ответа на противолимфомную терапию 1-й линии

на момент постановки диагноза ФЛ (продолжительность жизни менее 36 мес, развитие рецидива ранее чем через 24 мес после завершения противолимфом-

ной терапии), в группе с агрессивным течением заболевания (с неблагоприятным прогнозом) и в контрольной группе. Установлено, что в 1-й группе больные имели достоверно более высокую оценку по шкале ECOG, достоверно чаще наблюдали снижение уровня общего белка сыворотки крови, а также гемоглобина < 120 г/л, заболевание часто сопровождалось симптомами интоксикации, на момент диагностики ФЛ у значительного числа больных имело место поражение более 1 экстранодального органа, достоверно чаще диагностировали поражение селезенки, качество ответа на противолимфомную терапию 1-й линии было достоверно хуже, в соответствии с критериями FLIPI почти половина больных была отнесена к группе высокого риска.

Мы проанализировали прогностическое значение тех факторов, которые не входят в существующие прогностические модели. Достоверно отрицательное влияние на ОВ и ВБП оказывают снижение уровня общего белка сыворотки крови, поражение селезенки и неудовлетворительный ответ на противолимфомную терапию 1-й линии (стабилизация опухоли или ее прогрессия). Наличие симптомов интоксикации достоверно ухудшает показатели ОВ и не влияет на ВБП. Перечисленные признаки целесообразно использовать в выборе лечебной тактики при анализе риска прогрессирования у больных ФЛ.

Прогностическое значение снижения уровня общего белка и поражения селезенки не упоминалось ни в одном из ранее опубликованных исследований и было нами проанализировано впервые.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Casulo C., Byrtek M., Dawson K.L. et al. Early relapse of follicular lymphoma after rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone defines patients at high risk for death: an analysis from the National LymphoCare Study. *J Clin Oncol* 2015;33(23): 2516–22. DOI: 10.1200/JCO.2014.59.7534. PMID: 26124482. PMCID: 26124482.
- Zelenetz A.D., Abramson J.S., Advani R.H. et al. Non-Hodgkin's lymphomas. *J Natl Compr Canc Netw* 2011;9(5):484–560. PMID: 21550968.
- Liu Q., Fayad L., Cabanillas F. et al. Improvement of overall and failure-free survival in stage IV follicular lymphoma: 25 years of treatment experience at The University of Texas M. D Anderson Cancer Center. *J Clin Oncol* 2006;24(10):1582–9. DOI: 10.1200/JCO.2005.03.3696. PMID: 16575009.
- Fisher R.I., LeBlanc M., Press O.W. et al. New treatment options have changed the survival of patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2005;23(33): 8447–52. DOI: 10.1200/JCO.2005.03.1674. PMID: 16230674.
- Swenson W.T., Wooldridge J.E., Lynch C.F. et al. Improved survival of follicular lymphoma patients in the United States. *J Clin Oncol* 2005;23(22):5019–26. DOI: 10.1200/JCO.2005.04.503. PMID: 15983392.
- Press O.W., Unger J.M., Rimsza L.M. et al. Phase III randomized intergroup trial of CHOP plus rituximab compared with CHOP chemotherapy plus (131) iodine-tositumomab for previously untreated follicular non-Hodgkin lymphoma: SWOG S0016. *J Clin Oncol* 2013;31(3):314–20. DOI: 10.1200/JCO.2012.42.4101. PMID: 23233710. PMCID: PMC3732010.
- Murakami S., Kato H., Higuchi Y. et al. Prediction of high risk for death in patients with follicular lymphoma receiving rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone in first-line chemotherapy. *J Ann Hematol* 2016;95(8):1259–69. DOI: 10.1007/s00277-016-2690-2. PMID: 27220639.
- Rummel M.J., Niederle N., Maschmeyer G. et al. Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 2013;381(9873):1203–10. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61763-2. PMID: 23433739.
- Salles G., Seymour J.F., Offner F. et al. Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab

- plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial. *Lancet* 2011;377(9759):42–51. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)62175-7. PMID: 21176949.
10. Solal-Celigny P., Roy P., Colombat P. et al. Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *J Blood* 2004;104(5):1258–65. DOI: 10.1182/blood-2003-12-4434. PMID: 15126323.
11. Federico M., Bellei M., Marcheselli L. et al. Follicular Lymphoma International Prognostic Index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the International Follicular Lymphoma Prognostic Factor Project. *J Clin Oncology* 2009;27(27):4555–62. DOI: 10.1200/JCO.2008.21.3991. PMID: 19652063.
12. O’Shea D., O’Riain C., Taylor C. et al. The presence of TP53 mutation at diagnosis of follicular lymphoma identifies a high-risk group of patients with shortened time to disease progression and poorer overall survival. *Blood* 2008;112(8):3126–9. DOI: 10.1182/blood-2008-05-154013. PMID: 18628487. PMCID: PMC2954748.
13. Dave S.S., Wright G., Tan B. et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med* 2004;351(21):2159–69. DOI: 10.1056/NEJMoa041869. PMID: 15548776.
14. Andjelic B., Todorovic-Balint M., Antic D. et al. Follicular lymphoma patients with a high FLIPI score and a high tumor burden: a risk stratification model. *Vojnosanit Pregl* 2015;72(1):26–32. PMID: 26043587.
15. Prochazka V., Papajik T., Jarosova M. et al. Prognostic factors in follicular lymphoma in the rituximab era: how to identify a high-risk patient? *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011;155(2):99–108. PMID: 21804618.
16. Swerdlow S.H., Campo E. Harris N.L. et al. (eds.) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. WHO Press 2008:439.
17. Cheson B.D., Horning S.J., Coiffier B. et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin’s lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol* 1999;17(4):1244. PMID: 10561185.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКА RRM1 В ТКАНИ СЕРОЗНОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКОВ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

С.А. Калужный, Е.А. Дудко, В.Т. Заркуа, Е.А. Богуш, В.Ю. Кирсанов, С.Д. Коломийцев,
Н.О. Вихлянцева, А.С. Тюляндина, Т.А. Богуш

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва,
Каширское шоссе, 24

Контакты: Сергей Андреевич Калужный labmedchem@mail.ru

Цель исследования — определение уровня экспрессии RRM1 в ткани серозной аденокарциномы яичников.

Материалы и методы. Определение уровня экспрессии RRM1 в ткани серозной аденокарциномы яичников проведено с использованием разработанного и запатентованного авторами строго количественного иммунофлуоресцентного метода, ассоциированного с проточной цитофлуориметрией.

Результаты. Экспрессия RRM1 выявлена в 100 % образцов серозной аденокарциномы яичников со значительными отличиями в уровне показателя у разных пациенток. Высокий уровень RRM1 (≥ 40 % клеток, экспрессирующих маркер) выявлен в 65 % исследованных образцов опухолей, низкий (< 40 % клеток, экспрессирующих маркер) — в 35 % случаев.

Заключение. Данные о низкой экспрессии RRM1 в 1/3 исследованных образцов первичной серозной аденокарциномы яичников согласуются с клиническими наблюдениями эффективности монотерапии гемцитабином у 25–30 % больных. Авторы считают, что строго количественное определение уровня маркера в опухолевой ткани может помочь в преодолении неоднозначности оценок клинической значимости RRM1 в предсказании эффективности лечения гемцитабином.

Ключевые слова: серозная аденокарцинома яичников, гемцитабин, RRM1, проточная цитофлуориметрия

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-87-89

QUANTITATIVE IMMUNOFLUORESCENT DETECTION OF RRM1 PROTEIN IN OVARIAN CANCER TISSUE BY FLOW CYTOMETRY

S. A. Kalyuzhny, E. A. Dudko, V. T. Zarkua, E. A. Bogush, V. Yu. Kirsanov, S. D. Kolomytsev, N. O. Vichlyantseva,
A. S. Tyulandina, T. A. Bogush

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Objective of the research was determination level of RRM1 expression in ovarian cancer tissue.

Materials and methods. To avoid disadvantages of those evaluations, the present study of the RRM1 expression level in ovarian cancer tissue determination was held using strictly quantitative immunofluorescence flow cytometry-associated method developed by the authors.

Results. RRM1 expression was detected in 100 % of samples of ovarian serous adenocarcinoma, with significant differences in the indicator level in variable patients. The high level of RRM1 (≥ 40 % of cells expressing the marker) was detected in 65 % of the tumor samples studied, low (< 40 %) — in 35 % of cases. Data on the lower expression of RRM1 in one-third of the test samples from primary serous ovarian cancer corresponds with clinical observations of gemcitabine monotherapy efficiency in 25–30 % of patients.

Conclusion. The authors believe that a strictly quantitative determination of the marker level in tumor tissue can help to overcome the ambiguity of RRM1 clinical significance estimation in gemcitabine treatment effectiveness prediction.

Key words: ovarian cancer, gemcitabine, RRM1, flow cytometry

Введение

Серозная аденокарцинома яичников — распространенное онкологическое заболевание, стандартом 1-й линии химиотерапии которого является комбинация препаратов платины и таксанов [1]. При диагностировании резистентности часто назначают

из препаратов 2-й линии гемцитабин как в монотерапии, так и в комбинации с препаратами платины.

Гемцитабин представляет собой нуклеозидный аналог цитозина (2',2'-дифтор-дезоксцитидин), в механизме противоопухолевого действия которого главную роль играет нарушение синтеза ДНК. Активированный

гемцитабин в клетке ковалентно связывается с белком RRM1. Это мономер фермента рибонуклеотидредуктазы, тетрамер, включающий 2 субъединицы – RRM1 и RRM2. В экспериментальных исследованиях показано, что высокая экспрессия RRM1 ассоциирована с резистентностью к гемцитабину [2].

Клинические данные о предиктивной значимости экспрессии белка RRM1 в прогнозе резистентности к гемцитабину неоднозначны, хотя во многих исследованиях четко показано, что гиперэкспрессия RRM1 является предиктивным фактором худшего ответа на терапию гемцитабином [3, 4]. По нашему мнению, эти противоречия во многом связаны с тем, что в большинстве работ по оценке экспрессии RRM1 были использованы полуколичественные методы иммуногистохимии и полимеразной цепной реакции. Чтобы избежать недостатков таких оценок, в настоящем исследовании определение уровня экспрессии RRM1 в ткани серозной аденокарциномы яичников проведено с использованием разработанного и запатентованного авторами строго количественного иммунофлуоресцентного метода, ассоциированного с проточной цитофлуориметрией.

Материалы и методы

В работе исследовано 44 хирургических образца ткани серозной аденокарциномы яичников. Одноклеточные суспензии инкубировали с первичными (ab81085, Abcam) антителами в течение ночи, а затем 1,5 ч со вторичными (DyLight650, ab98510, Abcam) антителами. Для выведения из анализа дебриса и эритроцитов после завершения инкубации со вторичными антителами клетки инкубировали в течение 15 мин со специфическим красителем ДНК Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1,2 мкг/мл. В анализ включали только клетки с окрашенными ядрами, исключая клеточные конгломераты путем дополнительного гейтирования.

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter,

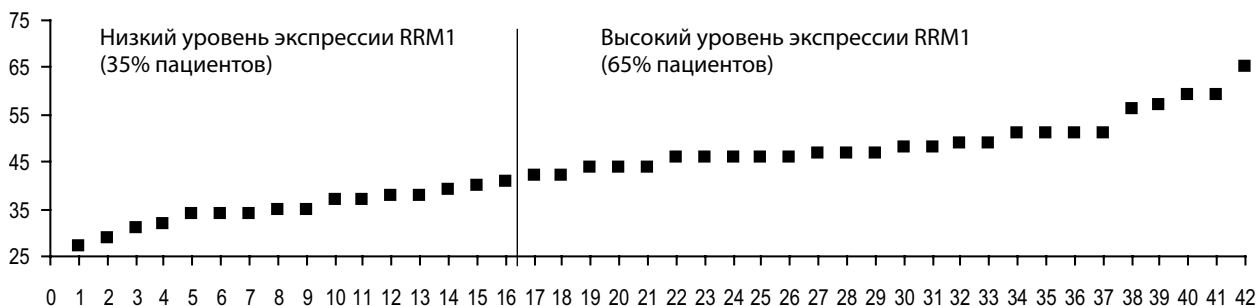
США). Для возбуждения флуоресценции использовали твердотельные диодные лазеры с длиной волны испускаемого света 405 и 638 нм. Регистрацию сигнала флуоресценции Hoechst 33258 проводили в канале FL-9, а для DyLight650 использовали канал FL-6. При измерении использовали средний показатель скорости подсчета клеток; число анализируемых событий – 5000.

Показатели экспрессии RRM1 анализировали с помощью программы FlowJo статистическим методом Колмогорова–Смирнова. Интенсивность экспрессии RRM1 рассчитывали как отношение специфической флуоресценции к контрольному показателю (только вторичные антитела): высокая – $\geq 2,5$; низкая – $< 2,5$ усл. ед. Уровень экспрессии RRM1 рассчитывали как процент специфически флуоресцирующих клеток относительно общего количества клеток, включенных в анализ: высокий – количество специфически окрашенных клеток в опухоли $\geq 40\%$, низкий $< 40\%$.

Результаты и обсуждение

При оценке уровня экспрессии RRM1 в ткани серозной аденокарциномы яичников экспрессия маркера выявлена в 100 % опухолей со значительными отличиями в уровне экспрессии маркера у разных пациентов (см. рисунок). Средний показатель уровня экспрессии RRM1 в целом по группе составил $40,4 \pm 9,9\%$ при минимальном и максимальном значениях количества клеток, экспрессирующих маркер, – 35 и 65 % соответственно.

Высокий уровень экспрессии RRM1 ($\geq 40\%$ клеток, экспрессирующих маркер) выявлен в 65 % исследованных образцов опухолей, при этом средний показатель в этой подгруппе составил $49,0 \pm 5,8\%$, а медиана – 48,0 % клеток, экспрессирующих маркер. Подгруппу с низким уровнем экспрессии RRM1 ($\geq 40\%$ клеток, экспрессирующих маркер) составили 35 % исследованных образцов опухолей при среднем значении показателя $33,2 \pm 6,9\%$ и медиане 34,5 %.



Уровень экспрессии RRM1 в ткани серозной аденокарциномы яичников. По оси абсцисс – номера исследованных образцов опухолей; по оси ординат – уровень экспрессии RRM1 (процент специфически окрашенных клеток относительно контроля). Вертикальная линия на рисунке разделяет образцы опухолей с низким ($\leq 40\%$ клеток, экспрессирующих маркер) и высоким ($> 40\%$ клеток, экспрессирующих маркер) уровнем экспрессии RRM1

Показатели средней интенсивности экспрессии RRM1 (отношение специфической флуоресценции к контрольному показателю) в ткани серозной аденокарциномы яичников в группах с высоким и низким уровнем маркера не различались и составили $2,9 \pm 0,7$ и $2,1 \pm 0,6$ усл. ед. соответственно ($p > 0,05$).

Полученные данные о низкой экспрессии RRM1 в 1/3 исследованных образцов первичной серозной аденокарциномы яичников согласуются с клиническими наблюдениями эффективности монотерапии гемцитабином у 25–30 % больных [5]. Это показывает, что строго количественное определение уровня маркера в опухолевой ткани может помочь в прео-

долении упомянутой выше неоднозначности оценок клинической значимости RRM1 в предсказании эффективности лечения гемцитабином. Сам же факт, что этот белок является предиктивным маркером, сомнений не вызывает, так как определяющая роль RRM1 в реализации противоопухолевого эффекта гемцитабина безусловна и подтверждена в многочисленных экспериментальных исследованиях [2, 3].

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (№ 15-04-06991-а, 16-34-01049-мол-а) и гранта Президента РФ МК-7709.2016.7.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Тюляндина А.С. Лекарственное лечение рака яичников. Практическая онкология 2014;15(4):168–75.
2. Jordheim L.P., Dumontet C. Review of recent studies on resistance to cytotoxic deoxynucleoside analogues. Biochim Biophys Acta 2007;1776(2):138–59. PMID: 17881132.
3. Besse V., Olaussen K.A., Soria J.C. ERCC1 and RRM1: ready for prime time? J Clin Oncol 2013;31(8):1050–60. DOI: 10.1200/JCO.2012.43.0900. PMID: 23401439.
4. Jordheim L.P., Sève P., Trédan O., Dumontet C. The ribonucleotide reductase large subunit (RRM1) as a predictive factor in patients with cancer. Lancet Oncol 2011;12(7):693–702. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70244-8. PMID: 21163702.
5. Edwards S.J., Barton S., Thurgar E., Trevor N. Topotecan, pegylated liposomal doxorubicin hydrochloride, paclitaxel, trabectedin and gemcitabine for advanced recurrent or refractory ovarian cancer: a systematic review and economic evaluation. Health Technol Assess 2015;19(7):1–11. DOI: 10.3310/hta19070. PMID: 25626481.

ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КЛЕТОК МЕЛАНОМНОЙ ЛИНИИ MEL CHER ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В РОСТОВОЙ СРЕДЕ С НИЗКОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ТЕЛЯЧЬЕЙ СЫВОРОТКИ

Л.Ф. Морозова, Н.М. Сураева, О.С. Бурова, А.Е. Бармашов, М.А. Барышникова

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Наталья Михайловна Сураева nsuraeva@yandex.ru

Введение. Клеточная линия меланомы человека mel Cher обладает ярко выраженным полиморфизмом клеток и по степени дифференцировки оценивается как низкодифференцированная меланома.

Цель исследования – получение и характеристика субклона клеток линии mel Cher 5C.

Материалы и методы. Для получения субклона клеток линии mel Cher 5C был использован метод колониеобразования в среде с пониженной до 5 % концентрацией эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Затем проведена селекция веретенновидных клеток, их длительное культивирование и оценка морфологических и иммунологических характеристик.

Результаты. При культивировании клеток меланомной линии mel Cher в ростовой среде с пониженной до 5 % концентрацией ЭТС развивались клетки mel Cher 5C, которые морфологически отличались от клеток исходной линии mel Cher. Они имели веретенновидную форму и обладали способностью формировать в процессе роста колонии сферического типа на поверхности монослоя. Клетки субклона росли более интенсивно в сравнении с клетками исходной линии, имели отличия по иммунологическому фенотипу и не экспрессировали HLA-DR-антигены.

Выводы. Клетки субклона обладали веретенновидной формой, в процессе роста формировали мономорфные колонии сферического типа, не экспрессировали антигены главного комплекса гистосовместимости II.

Ключевые слова: эмбриональная телячья сыворотка, опухолевая стволовая клетка, клетки линии меланомы, субклон

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-90-94

CHANGES IN THE MORPHOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF MEL CHER MELANOMA CELLS IN RESPONSE TO LOW CONCENTRATION OF EMBRYO CALF SERUM

L. F. Morozova, N. M. Suraeva, O. S. Burova, A. E. Barmashov, M. A. Baryshnikova

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Background. Human melanoma cell line mel Cher have a different cell forms and is appraised for grade of differentiation as low-differentiation melanoma.

Objective. The purpose of this study was development and characterization of subclone mel Cher 5C.

Materials and methods. For received subclone mel Cher 5C was applied method of colony formation in conditions with low concentration of embryo calf serum (5 %). Then was carry out selection spindle-like cells, their long cultivation and estimate morphological and immunological characteristics.

Results. Subclone mel Cher 5C cells differed for morphology from primary line mel Cher. This cells had spindle-like form and had capacity to form spherical type colony on the surface of monolayer during their growth. Subclone cells has more intensive growth compare with cells of primary line. Subclone cells had differences by immunological phenotype and didn't expressed antigene HLA-DR.

Conclusions. Subclone cells had a fusiform shape, in the growth process of the formed spheroid colonies monomorphic type, did not Express antigens of histocompatibility complex II.

Key words: embryo calf serum, cancer stem cells, melanoma cell line, subclone

Введение

Способность опухоли адаптироваться к меняющимся условиям окружающей среды, обусловленная гетерогенностью составляющих ее клеток, гарантирует ей не только самоподдержание, но и способность к инвазии и метастазированию. Какие клетки в популяции ответственны за эти процессы, и похожи ли механизмы запуска этих процессов в различных опухолевых тканях? Ответы на эти вопросы до сих пор являются главным предметом научных исследований в онкологии [1, 2]. В настоящее время в качестве претендента на роль инициатора механизмов опухолевой прогрессии, несмотря на отсутствие достоверного знания источников их происхождения, выдвинуты опухолевые стволовые клетки (СК).

В наших предыдущих исследованиях на клетках меланомы человека была предпринята попытка найти связь между приспособительными свойствами отдельных клеток и наличием у них маркеров, ответственных за фенотип СК. Клетки субклонов mel 1br 5C и mel 1br получены нами из исходной линии клеток эпителиоподобного вида после воздействия определенных факторов среды, а именно уменьшения концентрации ЭТС в культуре с 10 до 5 % и обработки куриным эмбриональным экстрактом (КЭЭ) [3, 4]. В этих экспериментах из одиночных клеток выросли колонии. Далее были отобраны колонии, состоящие из клеток веретеновидной формы (мезенхимальный тип), при этом в отличие от исходной линии клетки субклона mel 1br 5C показали иммунологический фенотип опухолевых СК, а клетки субклона mel 1br наряду с указанными признаками – фенотип эмбриональных СК по антигену Oct-4A. Важно отметить, что после воздействия КЭЭ выжили только клетки веретеновидной формы, т. е. в исходной популяции mel 1br в неблагоприятных условиях культивирования клетки веретеновидной формы имели селективное преимущество. Нас заинтересовал вопрос, произойдет ли аналогичная селекция популяции веретеновидных клеток в линии меланомы от другого пациента при уменьшении концентрации ЭТС в культуральной среде. Для проверки этого предположения нами была выбрана линия меланомы mel Cher, клетки которой отличались от клеток mel 1br ярко выраженным полиморфизмом и по морфологическим критериям оценивались как низкодифференцированные.

Цель исследования – получение и характеристика субклона клеток линии mel Cher 5C.

Материалы и методы

В работе использована стабильно перевиваемая клеточная линия меланомы человека mel Cher [5], полученная из опухолевого образца метастатического лимфатического узла пациентки с диагнозом «дис-

семированная меланома кожи», оперированной в НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Клетки из посевного банка мы культивировали в ростовой среде RPMI-1640 с 10 % ЭТС с добавлением 2 мМ L-глутамина и 0,04 мг/мл гентамицина при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Для образования колоний клетки предварительно культивировали в среде RPMI-1640 с 5 % ЭТС в течение 3 пассажей, а затем рассеивали на чашки Петри в дубликатах диаметром 60 мм в количестве 200–400 клеток на чашку и оставляли в инкубаторе на 14 сут. Каждую из сформировавшихся колоний, состоящих из клеток веретеновидной формы, снимали раствором Версена, переносили на другие чашки и продолжали культивировать в тех же условиях на протяжении более 30 пассажей. Смену среды на свежую проводили 1 раз в 3 сут. Для исследования морфологии растущих клеток их окрашивали по методу Лейшмана, окрашенные клетки оценивали под световым микроскопом при увеличении ×100. Экспрессию антигенов на клетках определяли в реакции непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител. Тестировали экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости I (HLA-ABC, Beckman Coulter, США) и II классов (HLA-DR, Beckman Coulter, США), меланоцитов (CD63, MACS, Miltenyi Biotec, Германия), клеточной адгезии (CD54, Beckman Coulter, США), гемопоэтической СК (CD34, MACS, Miltenyi Biotec, Германия), нелинейного антигена (CD24, BD, Pharmingen, США), опухолевой СК (CD133/2, CD117, MACS Miltenyi Biotec, Германия; CD44, BD Pharmingen, США), инициации апоптоза (CD95, Dako, Дания). Реакцию учитывали на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson, США).

Результаты и обсуждение

Клетки линии mel Cher, растущие в среде RPMI-1640 с добавлением 10 % ЭТС, образовывали адгезионный монослой. Линия mel Cher отличалась ярко выраженным полиморфизмом клеток различных размеров, вытянутой, удлинённой веретенообразной с тонкими отростками, округлой овальной и неправильной формы. Цитоплазма клеток была относительно обильной, негомогенной и содержала большое количество мелкозернистого пигмента – меланина. Ядра опухолевых клеток полиморфные, нормо- и гиперхромные с 1–3 ядрышками, строение хроматина мелкозернистое или мелкоглыбчатое, часто наблюдались почкование и фрагментация ядер. Встречались гигантские одноядерные и двухъядерные, а также многоядерные клетки. Нередко выявлялись митозы (рис. 1). При культивировании в среде RPMI-1640 с добавлением 5 % ЭТС в чашках диаметром 60 мм наблюдалась незначительная гибель клеток. Выросшие в этих

чашках колонии состояли из клеток 3 типов, различающихся своей морфологией. Первый тип был представлен веретеновидными клетками, 2-й – эпителиоподобными, а 3-й тип включал примерно в равной степени эпителиоподобные и веретеновидные клетки.

Мы обратили внимание на тот факт, что клетки 1-го типа по своей форме были похожи на веретеновидные клетки ранее полученных нами субклонов *mel Ibr* и *mel Ibr 5C* [2, 3], поэтому для дальнейшего изучения под микроскопом были отобраны только

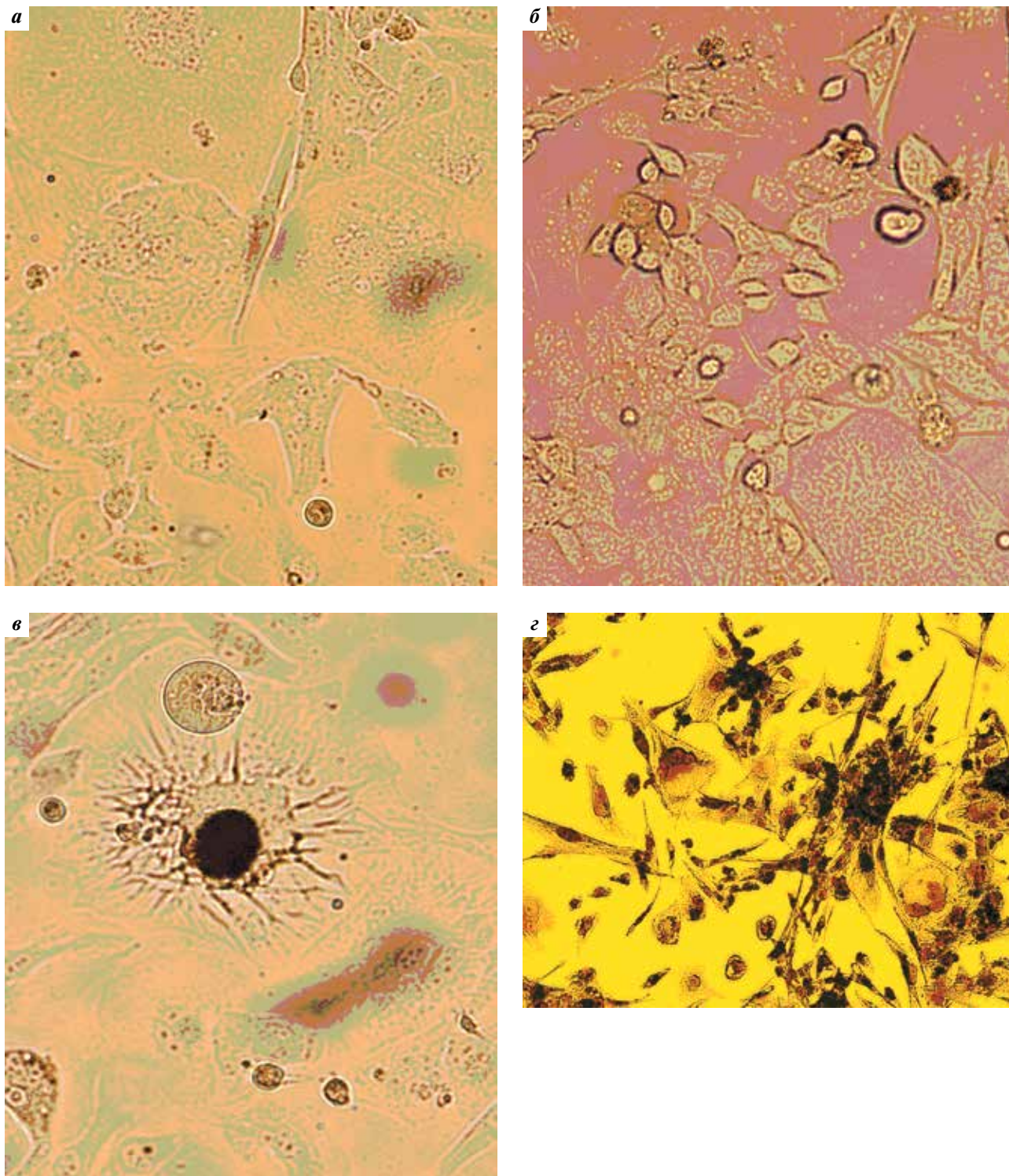


Рис. 1. Культура клеток линии меланомы человека *mel Cher*. $\times 100$: а, б, в – растущая культура *mel Cher*; з – фиксированная и окрашенная культура *mel Cher*

колонии 1-го типа. В течение 30 пассажей клетки не изменили свою морфологию. Полученная субпопуляция клеток была обозначена нами как субклон *mel Cher 5C*. Эти клетки существенно отличались от родительской популяции: они были веретеновидными, с крупным ядром и длинными отростками цитоплазмы, росли плотным монослоем и обладали способностью формировать на его поверхности выпуклые образования в виде сфероидов, сохраняли мономорфность на протяжении длительного пассирования и росли более интенсивно (рис. 2). Период их удвоения при одинаковой плотности посева превышал таковой исходной популяции в 2–3 раза. Таким образом, клетки субклона *mel Cher 5C* обладали характерными для эмбриональных СК свойствами – маленьким размером, большим ядром, высоким потенциалом пролиферации и способностью образовывать сфероиды. По морфологии клетки субклона *mel Cher 5C* практически не отличались от клеток субклона *mel Ibr 5C*.

С целью дальнейшей характеристики полученного субклона *mel Cher 5C* было проведено исследование его иммунологического фенотипа. Клетки субклона отличались от исходных клеток *mel Cher* по экспрессии HLA-DR антигена, тогда как экспрессия остальных антигенов не изменилась (табл. 1). Так, в клетках субклона *mel Cher 5C* почти не осталось HLA-DR-положительных клеток (26-й и 28-й пассажи), но не изменилось число клеток, экспрессирующих антиген HLA-ABC. Возможно, утрата антигенов гистосовместимости II класса у клеток субклона *mel Cher 5C* свидетельствует о дальнейшей прогрессии злокачественных потенций опухоли.

Таблица 1. Иммунологический фенотип клеток линии меланомы человека *mel Cher* и клеток ее субклона *mel Cher 5C*

Антиген	Количество антиген-положительных клеток, %	
	RPMI 1640 + 10 % ЭТС <i>mel Cher</i> , 28-й пассаж	RPMI 1640 + 5 % ЭТС <i>mel Cher 5C</i> , 26-й пассаж
HLA-ABC	97,3 ± 0,5	98,9 ± 0,2
HLA-DR	58,6 ± 0,7	1,0 ± 0,2
CD 54	51,3 ± 0,5	37,9 ± 1,0
CD 24	0,3 ± 0,2	0,7 ± 0,3
CD 44	93,3 ± 0,2	96,4 ± 0,2
CD 133/2	1,9 ± 0,5	2,6 ± 0,2
CD 117	1,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1
CD 34	1,5 ± 0,3	1,8 ± 0,1
CD 63	63,9 ± 2,0	99,5 ± 2,0
CD 95	60,3 ± 2,5	55,5 ± 0,2

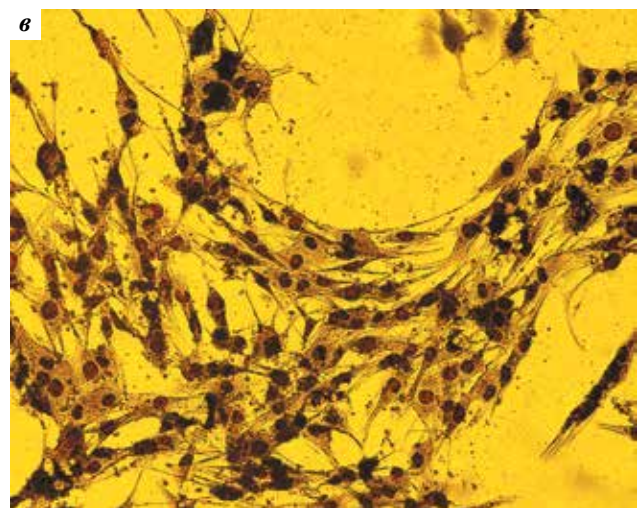
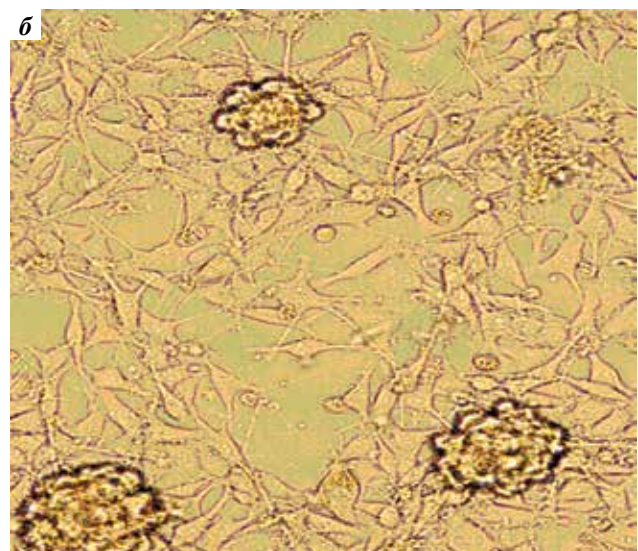
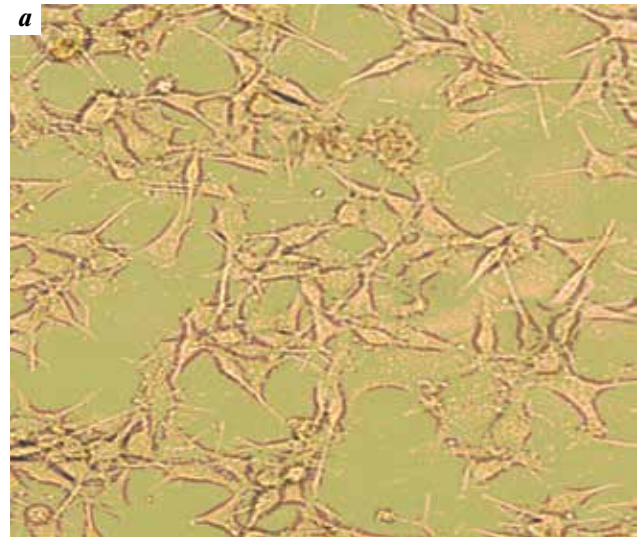


Рис. 2. Культура субклона клеток линии меланомы человека, *mel Cher 5C*, ×100: а, б – растущая культура *mel Cher 5C*; в – фиксированная и окрашенная культура *mel Cher 5C*

Аналогичные данные по этому антигену за исключением маркера CD133 были зафиксированы и у ранее полученных субклонов mel Ibr и mel Ibr 5C [2, 3]. Экспрессия антигенов главного комплекса гистосовместимости II класса не обнаружена и при культивировании клеток субклона в течение 6 пассажей в ростовой среде с повышенной до 10 % концентрацией ЭТС (табл. 2). Однако в отличие от ранее полученных субклонов mel Ibr и mel Ibr 5C [2, 3], на поверхности клеток субклона mel Cher 5C не экспрессировались антигены СК CD133. Полагаем, что эти антигены могут появиться при обработке клеток линии mel Cher КЭЭ по аналогии с результатами экспериментов с субклонами mel Ibr и mel Ibr 5C, где подобная обработка приводила к увеличению количества CD133-положительных клеток.

Заключение

На основании полученных данных можно предположить, что в исходной популяции линии mel Cher присутствует небольшое количество клеток с веретеновидной морфологией, не содержащих антигены гистосовместимости II класса (HLA-DR). В результате роста клеток mel Cher в среде со сниженной до 5 % концентрацией ЭТС, отбора колоний клеток веретеновидной формы и их дальнейшего длитель-

Таблица 2. Иммунологический фенотип клеток субклона линии меланомы человека mel Cher 5C при возврате клона в ростовую среду, содержащую 10 % ЭТС

Антиген	Количество антиген-положительных клеток в среднем, %	
	RPMI 1640 + 5 % ЭТС mel Cher 5C, 26 пассажей	RPMI 1640 + 10 % ЭТС mel Cher 5C, 6 пассажей
HLA-ABC	98.9 ± 0,2	98,3 ± 0,4
HLA-DR	0.4 ± 0,5	0,0 ± 0,4
CD-34	1.8 ± 0,2	0,1 ± 0,1
CD-24	0.3 ± 0,2	0,0 ± 0,1
CD-63	99.5 ± 2,1	52,0 ± 2,0
CD-54	37.9 ± 0,4	0,1 ± 0,1

ного культивирования произошла селекция форм с признаками СК. Потомки этих клеток были схожи с опухолевыми СК по своим морфологическим и пролиферативным характеристикам. Дальнейшее изучение полученного субклона mel Cher 5C как модели меланомных клеток с характеристиками СК позволит определить их роль в опухолевой прогрессии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Геращенко Т.С., Денисов Е.В., Литвяков Н.В. и др. Внутриопухолевая гетерогенность: природа и биологическое значение. *Биохимия* 2013;78(11):1531–49.
2. Iwasaki H., Suda T. Cancer stem cells and their niche. *Cancer Sci* 2009;100(7):1166–1172. DOI:10.1111/j.1349-7006.2009.01177.x. PMID: 19432904.
3. Сураева Н.М., Морозова Л.Ф., Самойлов А.В. и др. Изменение

- морфологических и иммунологических характеристик клеток меланомной линии mel Ibr в результате воздействия куриного эмбрионального экстракта. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2015;159(4):521–4.
4. Сураева Н.М., Морозова Л.Ф., Бурова О.С. и др. Изменение морфологических, иммунологических и генетических характеристик клеток меланомной линии mel Ibr

- при культивировании в ростовой среде с низкой концентрацией эмбриональной телячьей сыворотки. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;2:19–23.
5. Патент № 2364624 РФ Клеточная линия меланомы человека mel Cher, используемая для получения противоопухолевых вакцин. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Демидов Л.В. и др.; опубл. 20.08.2009. *Бюллетень* № 23.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ БЕТА-III-ТУБУЛИНА В ТКАНЯХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ И ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

М.М. Давыдов, И.А. Мамичев, Е.А. Дудко, Е.А. Богущ, В.Ю. Кирсанов, Б.Е. Полоцкий,
М.И. Давыдов, Т.А. Богущ

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Иван Андреевич Мамичев labmedchem@mail.ru

Введение. Бета-III-тубулин (TUBB3) может экспрессироваться в ткани немелкоклеточного рака легкого и считается маркером неблагоприятного прогноза заболевания и устойчивости опухоли к терапии таксанами и винкалкалоидами. В настоящее время недостаточно изучены особенности экспрессии данного маркера в зависимости от гистологического типа опухоли.

Цель исследования – охарактеризовать 2 группы пациентов с аденокарциномой легкого и плоскоклеточным раком (ПКР) легкого по уровню экспрессии TUBB3 в опухолевой ткани.

Материалы и методы. В работе исследованы образцы опухолевой ткани 43 пациентов с аденокарциномой и 39 с ПКР легкого. Образцы переводили в одноклеточную суспензию, фильтровали, фиксировали в 4 % растворе формальдегида, окрашивали моноклональными антителами к TUBB3 и вторичными антителами к IgG мыши и анализировали методом проточной цитофлуориметрии, разработанным в Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина Минздрава России.

Результаты. Средний уровень экспрессии TUBB3 в группе аденокарциномы достоверно выше, чем в группе ПКР ($33,1 \pm 12,4$ % клеток, экспрессирующих маркер, в ткани аденокарциномы против $26,0 \pm 13,6$ % клеток в ткани ПКР; различия статистически значимы). Средний уровень экспрессии TUBB3 в опухолевой ткани аденокарциномы у женщин составил $29,7 \pm 8,1$ %, у мужчин – $34,9 \pm 13,9$ % клеток, экспрессирующих маркер (различия статистически незначимы). Поскольку группа пациентов, страдавших аденокарциномой, была представлена как мужчинами, так и женщинами, в то время как группу пациентов, страдавших ПКР легкого, составили только мужчины, из анализа исключили пациентов женского пола. Статистически достоверные различия между группами сохранились.

Выводы. Экспрессия TUBB3 в ткани опухоли не зависит от пола, по крайней мере среди пациентов с аденокарциномой легкого, и в то же время уровень TUBB3 в ткани аденокарциномы выше по сравнению с уровнем в ткани ПКР.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, бета-III-тубулин, аденокарцинома легкого, плоскоклеточный рак легкого, проточная цитофлуориметрия

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-95-98

QUANTITATIVE ASSESSMENT OF BETA-III TUBULIN EXPRESSION IN LUNG ADENOCARCINOMA AND SQUAMOUS CELL CARCINOMA

M.M. Davydov, I.A. Mamichev, E.A. Dudko, E.A. Bogush, V. Yu. Kirsanov, B.E. Polotsky, M.I. Davydov, T.A. Bogush
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Background. Beta-III tubulin (TUBB3) is a tumor-specific isoform of the microtubule protein beta-tubulin. TUBB3 is considered to be a marker of adverse prognosis and tumor resistance to therapy with taxanes and Vinka alkaloids. Association between TUBB3 expression and histological type of the tumor has not been studied properly yet.

Objective. The expression level of TUBB3 in non-small cell lung cancer biopsy specimens has been measured on 2 groups of patients with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma.

Materials and methods. The samples with adenocarcinoma ($n = 43$) and squamous cell carcinoma ($n = 39$) were converted to suspension, filtered, fixed with 4 % formaldehyde, stained with monoclonal antibodies for TUBB3 and DyLight 650-conjugated secondary antibodies to mouse IgG and analyzed by flow-cytometry. The method was developed in N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center.

Results. The average level of TUBB3 expression in the adenocarcinoma group is higher than in the squamous cell carcinoma group (33.1 ± 12.4 % of cells expressing the marker in adenocarcinoma vs. 26.0 ± 13.6 % in squamous cell carcinoma; differences were statistically significant). The average level of TUBB3 expression in adenocarcinoma is 29.7 ± 8.1 % in female and is 34.9 ± 13.9 % in male (differences statistically insignificant). Since the group of patients with adenocarcinoma was presented by both men and women, while the group of patients with squamous cell carcinoma was only men, from the analysis was excluded all female patients. Differences between the groups remained statistically significant.

Conclusion. *TUBB3 expression in tumor tissue does not depend on the gender, at least among patients with adenocarcinoma of the lung, and at the same time, the level of TUBB3 in adenocarcinoma tissue is higher in comparison with squamous cell carcinoma tissue.*

Key words: *non-small cell lung cancer, beta-III tubulin, adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, flow cytometry*

Введение

Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) представляет собой морфологически неоднородную группу опухолей, обычно рассматриваемую отдельно от мелкоклеточного рака. Согласно новейшей гистологической классификации опухолей легких WHO/IASLC 2015 г. НМРЛ подразделяется на плоскоклеточный рак (ПКР) легкого, аденокарциному легкого, крупноклеточный рак легкого и некоторые более редкие формы, такие как аденосквамозный рак [1,2]. Каждая морфологическая форма опухоли имеет свои особенности клинического течения, лечения и прогноза.

Среди всех форм НМРЛ преобладают 2 гистологических подтипа: аденокарцинома и ПКР, на долю которых приходится около 80 % всех случаев.

Согласно клиническим данным ПКР более характерен для мужчин и, как правило, ассоциирован с курением, тогда как аденокарцинома чаще встречается у женщин и некурящих мужчин.

Некоторые клиницисты считают, что пациенты, страдающие аденокарциномой, в среднем имеют лучший прогноз общей выживаемости, чем пациенты, страдающие ПКР [3].

Клинические исследования эффективности ряда таргетных препаратов (пеметрексед, бевацизумаб и др.) свидетельствуют о наличии молекулярных прогностических и предиктивных опухолевых маркеров, специфичных по отношению к разным гистологическим формам заболевания. В рекомендациях ESMO 2010 г. подчеркивается необходимость дифференцировать по крайней мере плоскоклеточный и непластоклеточный гистологические подтипы НМРЛ при назначении 1-й линии лечения [4]. В последних клинических рекомендациях ASCO приведены алгоритмы использования специфических режимов лечения в зависимости от результатов гистологического анализа [5].

Известно, что для определенных гистологических подтипов НМРЛ характерны специфические генетические изменения. В последнее время предприняты попытки классифицировать основные мутации и профили экспрессии генов, присущие тому или иному подтипу. К примеру, установлено, что мутации EGFR и транслокации ALK-EML4 более характерны для аденокарциномы [6, 7], амплификация FGFR1 и SOX2 – для ПКР [8, 9]. Ранее нами была установлена более выраженная экспрессия эстрогеновых рецепторов бета в ткани аденокарциномы легкого по сравнению с ПКР [10].

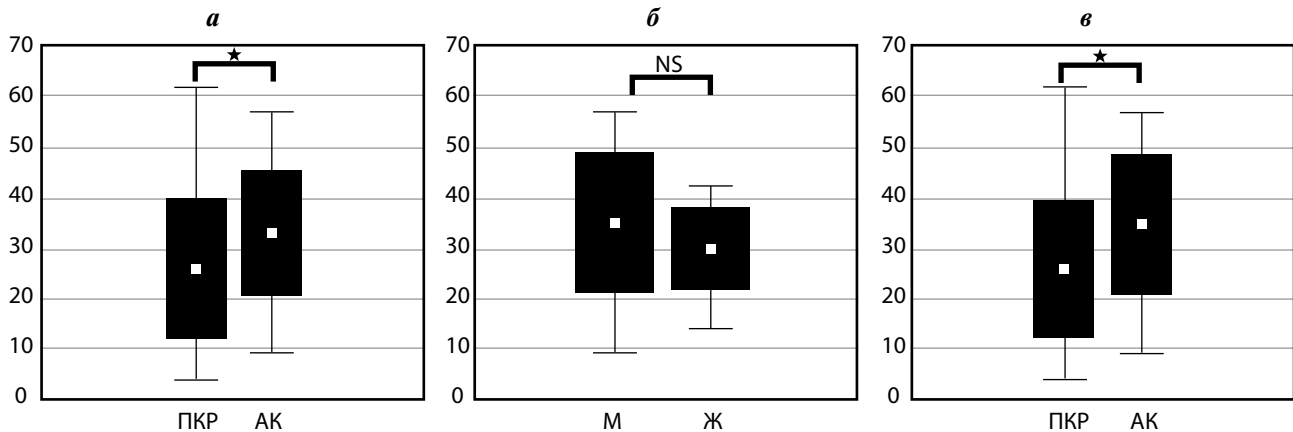
В настоящей работе охарактеризованы 2 группы пациентов по уровню бета-тубулина (beta-III-tubulin, TUBB3) в опухолевой ткани в зависимости от гистологического типа новообразования: аденокарцинома легкого или ПКР. TUBB3 – характерная для опухолей изоформа белка микротрубочек бета-тубулина, экспрессия которой запускается в ответ на гипоксию и гормональную стимуляцию. Более того, TUBB3 считают маркером неблагоприятного прогноза заболевания и устойчивости к антитубулиновым агентам – таксанам и винкалкалоидам, широко используемым в терапии НМРЛ.

Материалы и методы

Исследование проведено с использованием разработанной и запатентованной в лаборатории методики [10]. Кратко: хирургические образцы ткани НМРЛ пациентов, оперированных в РОНЦ им Н.Н. Блохина, тщательно измельчали, инкубировали в растворе Версена при 37 °С в течение 30 мин, гомогенизировали и фильтровали через фильтры диаметром 40 мкм. Полученную суспензию центрифугировали, ресуспендировали осадок в фосфатном буферном растворе (рН 7,4) и фиксировали в 4 % растворе формальдегида. Суспензионные образцы инкубировали с первичными (ab7751) антителами в течение ночи и затем 1,5 ч со вторичными (ab98729) антителами, конъюгированными с DyLight650. Полученную суспензию анализировали на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Уровень экспрессии TUBB3 определяли как отношение количества специфически флуоресцирующих клеток к общему количеству клеток, вычисленное в программе FlowJo 10.0 по статистическому критерию Колмогорова–Смирнова. Обработка количественных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica (StatSoft, США) версии 6.0. Суммарно проанализировано 82 хирургических биопсийных образца опухолевой ткани. Для оценки различий между попарно сравниваемыми группами по доле специфически флуоресцирующих клеток мы использовали параметрический *t*-критерий Стьюдента и его непараметрический аналог – *U*-критерий Манна–Уитни. Выбранный критерий статистической значимости различий: $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы количественная оценка экспрессии TUBB3 в ткани НМРЛ проведена в 2 груп-



Уровень экспрессии бета-III-тубулина (TUBB3) в опухолевых образцах больных немелкоклеточным раком легкого (в % окрашенных клеток): а – сравнительная оценка экспрессии TUBB3 в опухолевой ткани в зависимости от гистотипа без учета пола пациентов; б – сравнительная оценка экспрессии TUBB3 в ткани аденокарциномы в зависимости от пола пациентов; в – сравнительная оценка экспрессии TUBB3 в зависимости от гистотипа у пациентов мужского пола. Белый квадрат в центре – среднее, закрашенная область – стандартное отклонение, вертикальные линии – разброс данных; ПКР – плоскоклеточный рак, АК – аденокарцинома, М – мужчины, Ж – женщины; * различия статистически значимы, NS – различия статистически незначимы

пах сравнения без учета пола пациентов: аденокарцинома легкого ($n = 43$) и ПКР легкого ($n = 39$). Показано, что доли клеток, экспрессирующих TUBB3 (т. е. уровень экспрессии маркера в ткани), сильно различаются между образцами: от 9 до 57 % клеток в группе аденокарциномы и от 4 до 62 % в группе ПКР. Несмотря на близкие минимальные и максимальные значения показателя, данные показывают, что средний уровень экспрессии TUBB3 в группе аденокарциномы достоверно выше, чем в группе ПКР; $33,1 \pm 12,4$ % клеток, экспрессирующих маркер, в ткани аденокарциномы против $26,0 \pm 13,6$ % клеток в ткани ПКР; $p = 0,01$ по критериям Стьюдента и Манна–Уитни (см. рис. а).

Учитывая экспериментальные данные об эстрогензависимой экспрессии TUBB3 [11] и разное течение заболевания у мужчин и женщин, мы предположили, что выявленные различия экспрессии TUBB3 в ткани аденокарциномы и в ткани ПКР легкого могут быть ассоциированы с гендерной принадлежностью. Однако разделение пациентов, страдающих аденокарциномой, на подгруппы женщин ($n = 15$) и мужчин ($n = 28$) и сравнение уровня экспрессии маркера в опухолевой ткани в этих подгруппах не выявили статистически достоверных различий (см. рис. б). Средний уровень экспрессии TUBB3 в опухолевой ткани у женщин составил $29,7 \pm 8,1$ %, у мужчин – $34,9 \pm 13,9$ % клеток, экспрессирующих маркер ($p = 0,20$ и $0,13$ по критериям Стьюдента и Манна–Уитни соответственно).

Для дополнительной оценки возможной ассоциации экспрессии TUBB3 с гистологическим типом опухоли легкого, выявленной на первом этапе работы (см. рис. а), проведена дополнительная стратификация исследованных образцов в группах сравнения.

Поскольку группа пациентов, страдавших аденокарциномой, была представлена как мужчинами, так и женщинами, в то время как группу пациентов, страдавших ПКР легкого, составили только мужчины, из анализа исключили пациентов женского пола (см. рис. б). Сравнительный анализ выявил статистически достоверные различия между получившимися группами. Средний показатель экспрессии TUBB3 в группе аденокарциномы ($n = 28$) составил $34,9 \pm 13,9$ %, а в группе ПКР ($n = 39$) он остался равным $26,0 \pm 13,6$ % клеток, экспрессирующих маркер ($p = 0,01$, критерии Стьюдента и Манна–Уитни). Таким образом, можно сделать вывод: экспрессия TUBB3 в ткани опухоли не зависит от пола пациента, по крайней мере среди пациентов, страдающих аденокарциномой легкого, в то же время уровень TUBB3 в ткани аденокарциномы выше такового в ткани ПКР легкого.

Обсуждая полученные результаты в целом, следует отметить, что повышенная экспрессия TUBB3 в ткани аденокарциномы по сравнению с ПКР легкого уже была продемонстрирована в ряде исследований [12] с использованием иммуногистохимического метода, который не исключает погрешностей, связанных с гетерогенностью опухоли и субъективной оценкой результатов.

В настоящей работе, выполненной с использованием строго количественного иммунофлуоресцентного метода с привлечением проточной цитофлуориметрии, получено подтверждение этого феномена, который на первый взгляд представляется не очевидным.

Согласно данным литературы аденокарцинома легкого имеет более благоприятное клиническое течение по сравнению с таковым при ПКР легкого

[3]. В то же время экспрессия опухолевого маркера TUBB3, ассоциированного с неблагоприятным прогнозом заболевания, более выражена именно в группе пациентов, страдающих аденокарциномой. По-видимому, потенциально онкогенные функции TUBB3 в ткани аденокарциномы маскируются другими, благоприятными факторами, которых, судя по клиническим данным, при аденокарциноме больше, чем при ПКР.

Иными словами, оценка экспрессии в опухолевой ткани лишь одного опухолевого белка, прогностическая и/или предиктивная значимость которого безусловно доказана в фундаментальных исследованиях, недостаточна для прогноза течения болезни в клинике.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (№ 15-04-06991-а, 16-34-01049-мол-а) и гранта Президента РФ МК-7709.2016.7.

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

1. Владимирова Л. Ю., Кит О. И., Шолохова Е. А. Роль гистологического и молекулярного анализа в выборе метода лечения немелкоклеточного рака легкого поздних стадий. Фарматека 2012;241(8):9–22.
2. Travis W.D., Brambilla E., Nicholson A.G. et al. The 2015 world health organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. J Thorac Oncol 2015;10(9):1243–60. DOI: 10.1097/JTO.0000000000000630. PMID: 26291008.
3. Hirsch F.R., Spreafico A., Novello S. et al. The prognostic and predictive role of histology in advanced non-small cell lung cancer: a literature review. J Thorac Oncol 2008;3(12):1468–81. DOI: 10.1097/JTO.0b013e318189f551. PMID: 19057275.
4. D'Addario G., Fruh M., Reck M. et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2014;25(3):27–39. DOI:10.1093/annonc/mdu199. PMID: 25115305.
5. Azzoli C.G., Temin S., Aliff T. et al. 2011 focused update of 2009 American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update on chemotherapy for stage IV non-small cell lung cancer. J Oncol Pract 2012;8(1):63–6. DOI: 10.1200/JOP.2011.000374. PMID: 22548014.
6. Shaw A.T., Yeap B.Y., Mino-Kenudson M. et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. J Clin Oncol 2009;27(26):4247–53. DOI:10.1200/JCO.2009.22.6993. PMID: 19667264.
7. Shigematsu H., Lin L., Takahashi T. et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. J Natl Cancer Inst 2005;97(5):339–46. PMID: 15741570.
8. Bass A.J., Watanabe H., Mermel C.H. et al. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. Nat Genet 2009;41(11):1238–42. DOI: 10.1038/ng.465. PMID: 19801978.
9. Weiss J., Sos M.L., Seidel D. et al. Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. Sci Transl Med 2010;2(62):62–93. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001451. PMID: 21160078.
10. Богуш Т.А., Шатурова А.С., Дудко Е.А. и др. Количественная иммунофлуоресцентная оценка с использованием проточной цитофлуориметрии экспрессии эстрогеновых рецепторов β в солидных опухолях человека. Вестник Московского университета, сер. 2. Химия 2011;52(4):305–12.
11. Saussede-Aim J., Matera E.L., Ferlini C. et al. Beta-3-tubulin is induced by estradiol in human breast carcinoma cells through an estrogen-receptor dependent pathway. Cell Motil Cytoskeleton 2009;66(7):378–88. DOI: 10.1002/cm.20377. PMID: 19466750.
12. Reiman T., Lai R., Veillard A.S. et al. Cross-validation study of class III beta-tubulin as a predictive marker for benefit from adjuvant chemotherapy in resected non-small-cell lung cancer: analysis of four randomized trials. Ann Oncol 2012;23(1):86–93. DOI: 10.1093/annonc/mdr033. PMID: 21471564.

РОЛЬ КОСТНОГО МОЗГА В ПРОГНОЗЕ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМЫ

Н. Н. Тупицын, Н. А. Фалалева, А. В. Моженкова, А. И. Павловская

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Наталья Александровна Фалалева falaleeva-n@mail.ru

Введение. Костный мозг (КМ) является одним из самых частых участков метастатического поражения при фолликулярной лимфоме (ФЛ), которое диагностируется в 40–70 % случаев. Доказана независимая от прочих признаков неблагоприятная роль поражения КМ в прогнозе ФЛ (прогностические индексы FLIPI-2).

Цель исследования – оценка прогностической роли поражения КМ и взаимосвязи этого показателя с особенностями эритропоэза у больных ФЛ.

Материалы и методы. Проведена гистологическая оценка поражения КМ у 269 больных ФЛ. Оценка показателей гемопоэза, в частности эритроидного роста КМ, проведена на основании показателей миелограммы.

Результаты. Поражение КМ, по данным гистологического исследования трепанобиоптатов, установлено в 37,9 % случаев ФЛ (102 из 269 больных). При исследовании показателей общей выживаемости у 196 больных на протяжении всего периода наблюдения и лечения (максимально 215 мес, медиана 48 мес) не установлено взаимосвязи поражения КМ с прогнозом, $p = 0,18$. Вместе с тем установлено, что прогностическое значение поражения КМ реализуется при длительном наблюдении за больными. Поражение КМ явилось фактором неблагоприятного прогноза на сроках наблюдения от 48 до 215 мес, $p = 0,04$. Прогностическое значение имел не только сам факт поражения КМ, но и характер роста опухолевых клеток: при межфолликулярном типе очагового поражения показатели выживаемости существенно ухудшились ($p = 0,02$) по сравнению со случаями паратрабекулярного или смешанного (пара- и межтрабекулярного) типа поражения. По данным гистологического исследования, установлена обратная взаимосвязь поражения КМ с особенностями эритропоэза. Так, при наличии поражения увеличение количества оксифильных нормобластов отмечено в 67 % случаев, а при отсутствии – в 78 % ($p = 0,043$). Увеличение количества оксифильных нормобластов в КМ больных ФЛ не влияло на показатели общей выживаемости больных ($p = 0,89$).

Выводы. Поражение КМ неблагоприятно влияет на показатели выживаемости больных ФЛ только в поздние сроки наблюдения (более 48 мес). Помимо самого факта поражения неблагоприятную прогностическую роль играет очаговый межтрабекулярный характер роста опухолевых клеток. Отмечена обратная взаимосвязь поражения КМ и увеличения количества оксифильных нормобластов в КМ.

Ключевые слова: фолликулярная лимфома, костный мозг, прогноз

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-99-102

BONE MARROW IN FOLLICULAR LYMPHOMA PROGNOSIS

N. N. Tupitsyn, N. A. Falaleeva, A. V. Mozhenkova, A. I. Pavlovskaya

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe, Moscow, 115478, Russia

Background. Bone marrow is the most frequent metastatic site in follicular lymphoma, 40–70 % cases. It's unfavourable prognostic role is stated in the index FLIPI-2 (Follicular Lymphoma International Prognostic Index-2).

Objective. To study both prognostic role of bone marrow involvement and it's relation to erythropoiesis peculiarities in follicular lymphoma was the purpose of this research.

Materials and methods. Histological study was performed in 269 follicular lymphoma patients. Erythropoiesis peculiarities were studied in that patients according to standard myelogram analysis.

Results. Bone marrow involvement was noted according to trephine biopsy section staining in 37,9 % of follicular lymphoma case (102 from 269). Bone marrow involvement did not influenced the prognosis (overall survival) in all period of observation ($p = 0,18$). Long-term survival (more than 48 months) was negatively influenced by bone marrow involvement ($p = 0,04$). Intertrabecular pattern of follicular lymphoma growth in bone marrow was negative prognostic factor ($p = 0,02$). We noted negative correlation between bone marrow involvement and the elevation of orthochromic normoblasts in bone marrow of patients with follicular lymphoma. In cause of bone marrow such elevation was noted in 67 %, and in the absense of involvement – in 78 % ($p = 0,043$). Elevation of orthochromic normoblasts did not influenced the overall survival of follicular lymphoma patients ($p = 0,89$).

Conclusion. Bone marrow involvement in follicular lymphoma plays prognostically unfavourable role in long-time observation periods (later than 48 months). The most unfavourable are the intertrabecular patchy lesions. Involvement of bone marrow is in opposite relations to elevation of orthochromic normoblast, but the latter sign is of no prognostic significance.

Key words: follicular lymphoma, bone marrow, prognosis

Введение

Костный мозг (КМ) играет важную патогенетическую роль при фолликулярной лимфоме (ФЛ). Родоначальные лимфомные клетки приобретают транслокацию t(14;18) именно на уровне костномозговых В-линейных предшественников [1]. КМ является одним из самых частых участков метастатического поражения при ФЛ, которое диагностируют в 40–70 % случаев [2]. Доказана независимая от прочих признаков неблагоприятная роль поражения КМ в прогнозе ФЛ [3]. Вместе с тем полного понимания роли КМ в прогнозе и патогенезе ФЛ нет. Это служит препятствием для разработки методов контроля уровня поражения КМ при ФЛ в процессе терапии и для установления необходимости эрадикации опухолевых клеток ФЛ в КМ. Одно из предположений состоит в том, что в КМ может присутствовать небольшое количество родоначальных клеток ФЛ, находящихся в основном в неделящемся состоянии. Эти клетки могут быть злокачественными или являться предшественниками злокачественных клеток. Костномозговые клетки ФЛ могут быть относительно резистентными к химиотерапии, что объясняет частые, иногда очень поздние рецидивы заболевания [4].

Цель исследования – оценка прогностического значения поражения КМ при ФЛ в условиях современного лечения данного заболевания и анализ взаимосвязи наличия метастазов ФЛ в КМ и особенностей гемопоэза у больных.

Материалы и методы

Работа выполнена в НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, где все больные проходили обследование и лечение в отделении химиотерапии гемобластозов.

Проведена гистологическая оценка поражения КМ у 269 больных ФЛ. Возраст больных колебался от 26 до 85 лет (средний возраст 56,2 года), преобладали женщины – 179, мужчин 90. Диагноз ФЛ во всех случаях был верифицирован методом иммуногистохимического исследования биопсийного материала первичной опухоли. Морфологическая и иммуногистохимическая диагностика ФЛ проведена в отделе патологической анатомии опухолей человека по результатам гистологического исследования опухолевой ткани с обязательным исследованием экспрессии CD20 в соответствии с критериями классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей ВОЗ 2008 г. [5].

Исследование гемопоэза проводили в морфологической группе лаборатории иммунологии гемопоэза под руководством проф. М.А. Френкель. Осуществляли забор аспирата КМ в объеме 0,3–0,5 мл из верхней задней ости подвздошной кости (*spina iliaca posterior superior*) по общепринятой методике.

Клеточность КМ (количество миелокариоцитов) определяли на гематологическом анализаторе Micros 60. Микроскопическое исследование КМ (миелограмма) в каждом случае выполняли 2 эксперта-гематолога.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программы SPSS Statistics for Windows.

Результаты и обсуждение

Исследование прогностической роли поражения КМ проведено у 196 больных ФЛ. Вовлечение КМ по данным гистологического исследования трепано-биоптатов установлено у 78 (39,8 %) пациентов.

При оценке общей выживаемости нами не установлено прогностического значения поражения КМ ($p = 0,18$) (рис. 1).

При детальном анализе кривых выживаемости видно, что они расходятся после 4 лет наблюдения и лечения, а в первые 4 года с момента постановки диагноза выживаемость больных с поражением КМ и без такового практически идентична.

Действительно, при анализе общей выживаемости больных в период 48–215 мес с момента установления диагноза ФЛ различие между группами достоверно. Общая выживаемость при длительном наблюдении проанализирована у 102 больных (40 с поражением КМ и 62 без такового). В эти сроки наблюдения поражение КМ является фактором неблагоприятного прогноза ($p = 0,04$, *log-rank*-текст) (рис. 2).

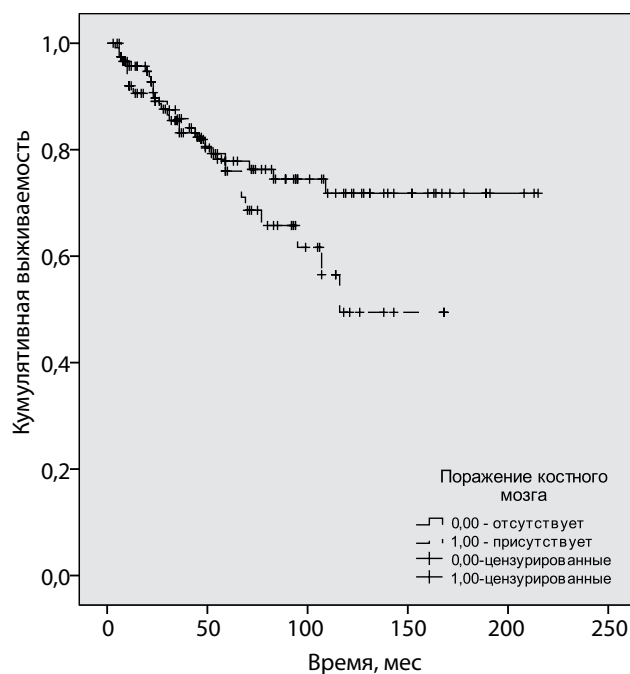


Рис. 1. Выживаемость больных фолликулярной лимфомой в зависимости от поражения костного мозга

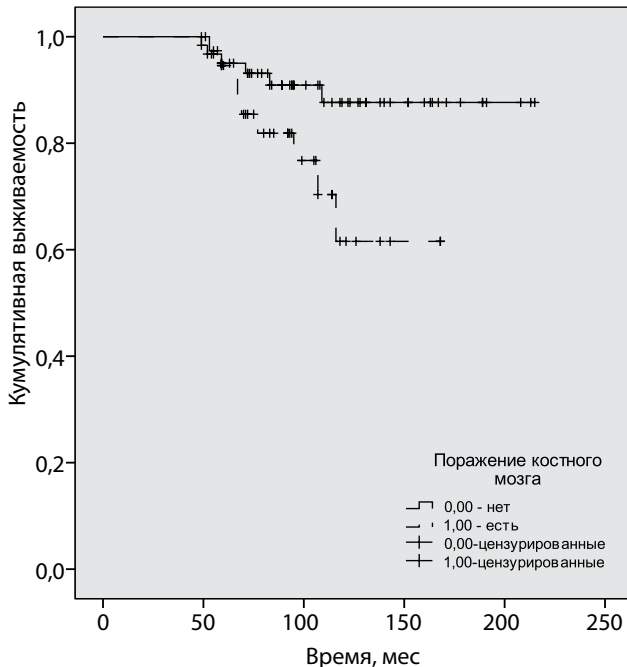


Рис. 2. Выживаемость больных фолликулярной лимфомой в зависимости от поражения костного мозга в сроки наблюдения 48–215 мес.

Таким образом, прогностическое значение поражения КМ реализуется в сроки наблюдения более 48 мес. Подобный сценарий возможен в случае наличия минимальной остаточной болезни в КМ, при которой остающиеся в КМ клетки ФЛ являются резистентными к проводимой терапии и достигают критической массы, приводящей к смерти пациентов в сроки более 4 лет от момента постановки диагноза. Данное предположение может служить серьезным аргументом в пользу необходимости разработки методов длительного контроля минимальной остаточной болезни в КМ на протяжении терапии ФЛ.

Мы оценили характер роста опухолевых клеток ФЛ в КМ. При оценке у 88 больных наиболее часто обнаруживали следующие типы поражения: очаговый паратрабекулярный рост – у 33 (37,5 %) больных, очаговый межтрабекулярный – у 12 (13,6 %), смешанный меж- и паратрабекулярный – у 27 (30,7 %). Прочие типы поражения были единичными.

Прогностическое значение типа поражения оценено у 55 больных (22 – паратрабекулярный тип роста, 1 – межтрабекулярный, 22 – смешанный). Интересно отметить, что тип поражения имел прогностическое значение. Случаи с паратрабекулярным и смешанным меж- и паратрабекулярным типами поражения характеризовались сравнительно лучшей выживаемостью, в то время как больные с межтрабекулярным типом поражения имели достоверно менее благоприятный прогноз (рис. 3). Различия были достоверными по всем 3 использованным статистическим тестам ($p = 0,02–0,04$).

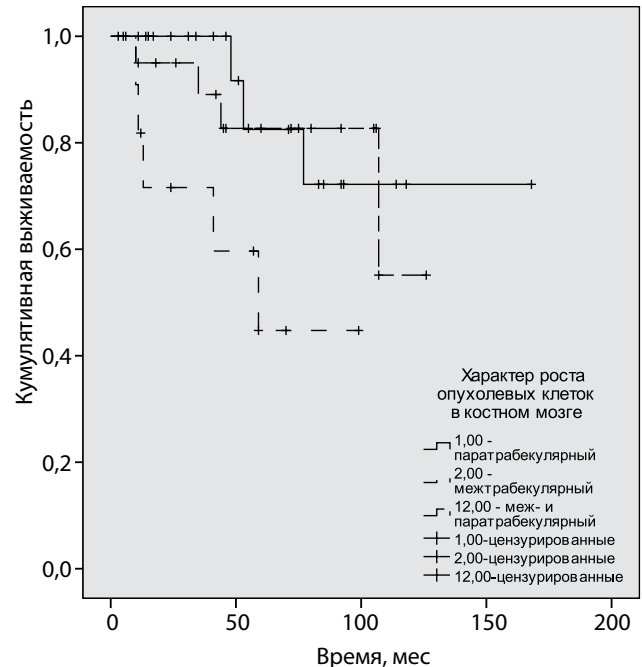


Рис. 3. Выживаемость больных фолликулярной лимфомой с поражением костного мозга в зависимости от характера роста опухолевых клеток.

Таким образом, при оценке поражения КМ при ФЛ наиболее частым является свойственный данному иммуноморфологическому варианту паратрабекулярный тип роста: в чистом виде или в сочетании с межтрабекулярным он отмечен у 68,2 % больных, имеющих поражение КМ. Наличие данного типа поражения характеризует группу больных с более благоприятным прогнозом. Вместе с тем не следует забывать, что у части больных (по нашим данным – 13,6 %) имеет место межтрабекулярный тип поражения. Именно при таком поражении отмечен неблагоприятный прогноз заболевания.

Мы оценили связь наличия поражения КМ при ФЛ с особенностями гемопоэза у больных. Наиболее характерным нарушением гемопоэза, отмеченным у 194 (73,8 %) из 263 больных ФЛ, являлось ускорение дифференцировки эритрокариоцитов с возрастанием количества их оксифильных форм. Оценка взаимосвязи особенностей эритроидной дифференцировки с поражением КМ по данным гистологического исследования показала наличие достоверной обратной взаимосвязи между этими признаками. В случаях отсутствия поражения КМ частота повышения количества оксифильных нормобластов составила 78,5 %, а при наличии поражения – лишь 67 % ($p = 0,043$). Сравнение показателей общей выживаемости больных с нормальным количеством оксифильных нормобластов ($n = 52$) и больных с повышенным содержанием этих клеток ($n = 139$) не выявило прогностической роли данного признака ($p = 0,89$).

Заключение

Поражение КМ у больных ФЛ является неблагоприятным фактором в долгосрочном прогнозе заболевания (более 48 мес). Наиболее неблагоприятным является межтрабекулярный тип опухолевого роста, который отмечен у 13, 6 % больных. Поскольку прогностическое значение поражения КМ реализуется

в поздние сроки наблюдения, целесообразна разработка методов мониторинга минимальной остаточной болезни при ФЛ. Специфическое вовлечение КМ при ФЛ находится в обратной взаимосвязи с возрастанием количества оксифильных нормобластов, однако этот признак не имеет прогностического значения.

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

1. Tsujimoto Y., Gorham J., Cossman J. et al. The t (14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985;229(4720):1390–93. PMID: 3929382.
2. Berget E., Helgeland L., Liseth K. et al. Prognostic value of bone marrow involvement by clonal immunoglobulin gene rearrangements in follicular lymphoma. *J Clin Pathol* 2014;67(12):1072–77. DOI: 10.1136/jclinpath-2014-202382. PMID: 25233852.
3. Federico M., Bellei M., Marcheselli L. et al. Follicular Lymphoma International Prognostic Index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the International Follicular Lymphoma Prognostic Factor Project. *J Clin Oncology* 2009;27(27):4555–62. DOI: 10.1200/JCO.2008.21.3991. PMID: 19652063.
4. Kluin P.M. Origin and migration of follicular lymphoma cells. *Haematologica* 2013;98(9):1331–32. DOI: 10.3324/haematol.2013.091546. PMID: 24006404.
5. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. (eds.) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. WHO Press 2008:439.



ФОТОДИТАЗИН® [fotoditazin]

фотосенсибилизатор хлоринового ряда

«ФОТОДИТАЗИН®» гель - РУ № ФСР 2012/130043 от 03.02.2012 г.

«ФОТОДИТАЗИН®» концентрат для приготовления раствора для инфузий - РУ № ЛС 001246 от 18.05.2012 г.



«ФОТОДИТАЗИН®» применяется для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии онкологических заболеваний различных нозологических форм, а так же патологий не онкологического характера в следующих областях медицины:

- › дерматология
- › гинекология
- › урология
- › торакальная хирургия
- › стоматология
- › нейрохирургия
- › офтальмология,
- › травматология и ортопедия
- › комбустиология
- › гнойная хирургия
- › ангиология

В соответствии с приказами МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РФ:

Приказ № 1629н от 29 декабря 2012 г.

«Об утверждении перечня видов высокотехнологичной медицинской помощи»


Приказ № 915н от 15 ноября 2012 г. «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи взрослому населению по профилю «онкология»

ООО «ВЕТА-ГРАНД» 

123056, Россия, г.Москва, ул. Красина, д.27, стр.2

тел.: +7(499)253-61-81, +7(499)250-40-00

e-mail: fotoditazin@mail.ru

 www.fotoditazin.com
www.фотодитазин.рф