



ISSN 1726-9784



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



Russian Journal
of Biotherapy

4/2014

ISSN 1726-9784

РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№4 Том 13 2014 г.

УДК 616-085.2/.3

Учредители

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

Главный редактор

А.Ю. Барышников, д-р мед. наук, проф.

Заместители главного редактора

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

Редколлегия

М.А. Барышникова, канд. фарм. наук (отв. секретарь),
О.А. Бочарова, д-р биол. наук, проф. (Москва),
А.К. Голенков, д-р мед. наук, проф. (Москва), Л.В. Демидов, д-р мед. наук, проф. (Москва),
И.В. Евсегнеева, д-р мед. наук, проф. (Москва), П.К. Иванов, д-р мед. наук (Москва),
З.Г. Кадагидзе, д-р мед. наук, проф. (Москва), И.Ю. Кубасова, канд. мед. наук (Москва),
В.В. Новиков, д-р биол. наук, проф. (Нижний Новгород), В.В. Решетникова, канд. тех. 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, канд. биол. наук (Москва), Р.И. Якубовская, д-р мед. наук, проф. (Москва)

«Российский биотерапевтический журнал» является рецензируемым изданием

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

Регистрационный номер:
ПИ №77-11695 от 21.01.2002 г.

Почтовый адрес:

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

Подписной индекс 81679

Объем 6 усл.-печ. листов,
подписано в печать 22.12.2014
Тираж 1000 экз.

Издательская группа РОНЦ:
115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24.
Тел. +7 (499) 324 24 70; ronc@list.ru
Координаторы: Е.Г. Турнянская, Б.Б. Крюков (макет)

Принт-менеджмент:
«Практическая медицина»
Тел.: +7 (495) 981-91-03
www.medprint.ru

СОДЕРЖАНИЕ №4 2014

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>К.И. Бражник, З.А. Соколова, М.А. Барышникова, Р.С. Билан, И.Р. Набиев, А.В. Суханова</i> РАЗРАБОТКА СУСПЕНЗИОННЫХ МИКРОЧИПОВ НА ОСНОВЕ МИКРОСФЕР, КОДИРОВАННЫХ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫМИ НАНОКРИСТАЛЛАМИ, И ПРИНЦИПЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ МНОГОПАРАМЕТРИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	3
<i>Р.С. Билан, К.И. Бражник, П.П. Шамс, Д. Бати, И.Р. Набиев, А.В. Суханова</i> ОРИЕНТИРОВАННЫЕ КОНЬЮГАТЫ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ И ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОКРИСТАЛЛОВ: НОВОЕ ПОКОЛЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ НАНОМЕТОК ДЛЯ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЙ ДЕТЕКЦИИ ОНКОМАРКЕРОВ	11
<i>О.О. Рябая, Т.А. Сидорова, А.Н. Иншаков, Э.Ш. Соломко, Е.В. Степанова</i> МОДУЛЯЦИЯ АУТОФАГИИ ВЛИЯЕТ НА ПИТОТОКСИЧНОСТЬ ПАКЛИТАКСЕЛА НА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА <i>IN VITRO</i>	17
<i>Т.В. Ахлынина, А.В. Мисюрин, Н.А. Лыжко, Ю.П. Финашутина, В.А. Мисюрин, Е.В. Аксенова, И.Н. Солдатова, А.П. Шпакова, Б.Б. Хасигова, Т.И. Булычева, О.С. Бурова</i> НАЛИЧИЕ ИММУНОГЕННОГО АНТИГЕНА В ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТКЕ СПОСОБСТВУЕТ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОМУ ДЕЙСТВИЮ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК	23
<i>И.С. Брюховецкий, А.С. Брюховецкий, П.В. Мищенко, Е.В. Толок, Р.Ю. Хотимченко</i> МИГРАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА К КЛЕТКАМ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЛИНИИ U87 <i>IN VITRO</i>	31
<i>А.И. Лебедева</i> АЛЛОГЕННЫЙ ГУБЧАТЫЙ БИОМАТЕРИАЛ – ИНГИБИТОР ФИБРОЗА ПОВРЕЖДЕННОЙ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ	37
<i>И.В. Уласов, Н.В. Каверина, А.Ю. Барышников</i> ИНФЕКЦИЯ КЛЕТОК ГЛИОМ ОНКОЛИТИЧЕСКИМ ВИРУСОМ СЕНСИБИЛИРУЕТ ИХ К ТЕРАПИИ ТЕМОЗОЛОМИДОМ	45
<i>И.С. Брюховецкий</i> ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЭКСПЕРИМЕНТЕ <i>IN VIVO</i> ПОСЛЕ КУРСА ХИМИОТЕРАПИИ НА МОДЕЛИ ГЛИОБЛАСТОМЫ У КРЫС	51
<i>С.С. Брусков, Ю.С. Колоскова, М.А. Грин, И.Г. Тиганова, О.Е. Пагина, Э.Р. Толордава, Т.В. Степанова, Г.А. Меегрович, Ю.М. Романова, А.Ф. Миронов</i> НОВЫЙ КАТИОННЫЙ ПУРПУРИНИМИД ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ БИОПЛЕНОК <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	59
<i>Р.И. Якубовская, А.Д. Плютинская, Е.А. Лукьянец</i> СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ В СИСТЕМЕ <i>IN VITRO</i>. ФТАЛОЦИАНИНЫ	65
<i>А.О. Райков, А.А. Матюшин, И.И. Краснюк</i> ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ МИТОКСАНТРОНА	73
ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ	
<i>И.Н. Григорьева, И.В. Манина, Н.В. Голубцова, А.В. Караулов</i> ТРУДНОСТИ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ АТОПИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ И ВОЗМОЖНЫЕ ПОДХОДЫ К ИХ РЕШЕНИЮ	79
<i>П.В. Гольшико</i> МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ АНТИАНГИОГЕННОЙ ТЕРАПИИ	83
Содержание журналов за 2014 год.....	22; 50; 58; 64
<i>К 60-летию Жумагазина Жанабая Дербесеновича</i>	93

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 535.371.2:546-022.53+616.65-006.6-097.1+576.3.08

*К.И. Бражник¹, З.А. Соколова^{1,2}, М.А. Барышникова^{1,2}, Р.С. Билан¹, И.Р. Набиев^{1,3}, А.В. Суханова^{1,3}***РАЗРАБОТКА СУСПЕНЗИОННЫХ МИКРОЧИПОВ НА ОСНОВЕ МИКРОСФЕР, КОДИРОВАННЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ НАНОКРИСТАЛЛАМИ, И ПРИНЦИПЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ МНОГОПАРАМЕТРИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**¹Лаборатория нано-биоинженерии, Национальный Исследовательский Ядерный Университет «МИФИ», Москва²ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва³Лаборатория по исследованиям в области нанонаук – EA4682, Университет г. Реймс, Шампань-Арденны, Франция**Контактная информация:***Суханова Алена Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нано-биоинженерии***адрес:** 115409 Москва, Каширское шоссе, д. 31; **тел.** +7(967)129-47-87**e-mail:** nanomedicine.mephi@gmail.com

Статья поступила 08.09.2014, принята к печати 24.11.2014.

Резюме

Комплексный многопараметрический анализ профиля специфических онкомаркеров в биологических жидкостях организма способен существенно повысить эффективность ранней диагностики онкологических заболеваний. В последнее время в клинико-лабораторной практике большие надежды связывают с многопараметрическими суспензионными микрочипами на основе микрочастиц, оптически кодированных флуорофорами. Кодированные флуорофорами микросферы с высокой точностью могут быть дифференцированы в суспензионном образце по индивидуальным оптическим кодам с помощью классической проточной цитофлуориметрии. В настоящем исследовании разработана универсальная многопараметрическая суспензионная система нового поколения на основе микросфер, кодированных флуоресцентными нанокристаллами. Система адаптирована для детекции двух форм ПСА – маркера РПЖ в сыворотке крови человека. Выявление маркеров с помощью сенсоров типа «лаборатория на микрочастице» основано на формировании и визуализации иммунного комплекса онкомаркера с распознающими АТ, высокоориентированного на поверхности флуоресцентных микросфер с помощью адаптерных молекул белка А. Введение в состав микрочипа молекул-адаптеров обеспечивает высокую эффективность детекции онкомаркеров и универсальность системы для определения различных профилей онкомаркеров.

Ключевые слова: флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы, квантовые точки, онкомаркеры, простатический специфический антиген, микросферы, суспензионные микрочипы, многопараметрический анализ, проточная цитометрия.

*K.I. Brazhnik¹, Z.A. Sokolova^{1,2}, M.A. Baryshnikova^{1,2}, R.S. Bilan¹, I.R. Nabiev^{1,3}, A.V. Sukhanova^{1,3}***DEVELOPMENT OF SUSPENSION BEAD-BASED MICROARRAYS ENCODED WITH FLUORESCENT NANOCRYSTALS AND PRINCIPLES OF THEIR APPLICATION FOR MULTIPLEXED CANCER DIAGNOSTICS**¹Laboratory of Nano-Bioengineering, National Research Nuclear University MEPHI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow²FSBSI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow³Laboratory of Research in Nanosciences - EA4682, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France**Abstract**

Multiplexed analysis of the specific cancer marker profile of biological fluids can substantially improve early diagnosis of cancer. In modern clinical laboratory practice, much hope is put on multiplexed suspension microarrays based on microbeads optically encoded with fluorophores. Individual optical codes make it possible to differentiate fluorophore-encoded microbeads in a suspension sample with high accuracy by means of classical flow cytometry. In this study, a versatile multiplexed suspension system of a new generation based on microbeads encoded with fluorescent nanocrystals has been developed. The system has been adapted for detecting two forms of PSA, serum marker of human prostate cancer. Lab-on-a-bead detection of the markers is based on the formation and imaging of an immune complex of the cancer marker with capture antibody, which is attached to the surface of the fluorescent microbeads in a highly oriented manner through the adapter molecule (protein A). The use of the adapter molecules ensures highly effective detection of cancer markers and the versatility of the microarray intended for determining different biomarker profiles.

Key words: fluorescent semiconductor nanocrystals, quantum dots, cancer markers, prostate-specific antigen, microbeads, suspension microarrays, multiplexed analysis, flow cytometry.

Введение

В настоящее время в лабораторной клинической диагностике онкологических заболеваний применяется две стратегии для количественной детекции специфических сывороточных онкомаркеров: традиционный твердофазный ИФА на планарных носителях [6; 15] и диагностика нового поколения с помощью суспензионных систем на основе кодированных микрочастиц [16; 22].

Твердофазный ИФА с использованием планшета или микрочипа остается наиболее распространенным методом определения специфических растворимых маркеров и активно используется в клинической практике [2; 3]. Тем не менее, многопараметрические суспензионные системы на основе оптически кодированных микрочастиц имеют ряд преимуществ перед системами на планарном носителе, расширяя возможности анализа специфических растворимых маркеров [14]. Для таких систем характерны высокая чувствительность, точность и скорость определения с помощью проточной цитометрии; кроме того, их использование дает возможность выявить одновременно несколько АГ в одном биологическом образце, причем количество выявляемых биомаркеров может быть достаточно велико [1; 8; 22].

Принцип работы многопараметрической суспензионной системы заключается в специфической визуализации и количественном определении каждого из анализируемых маркеров в составе иммунного комплекса, образовавшегося на поверхности оптически кодированных микрочастиц, с помощью проточной цитометрии. Каждому анализируемому маркеру присваивается индивидуальный оптический код популяции микросфер, который помогает количественно дифференцировать данный маркер в тестируемом биологическом образце. При смешивании нескольких популяций флуоресцентных микросфер, оптические коды которых присвоены разным биомолекулам, реализуется возможность многопараметрического количественного определения профиля специфических маркеров в одном образце [11; 22].

Для многоцветного оптического кодирования микросфер могут быть использованы классические органические флуорофоры или флуорофоры нового поколения – флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы, или КТ [7; 10; 11].

По сравнению с классическими органическими флуорофорами, КТ обладают уникальными оптическими свойствами [17]. Важнейшие из них – это высокие коэффициенты экстинкции и, как следствие, яркость излучения; узкий симметричный пик флуоресценции; прямая зависимость значения длины волны максимума флуоресценции от размера нанокристаллов, позволяющая задавать оптические свойства нанокристалла в процессе синтеза; широкие спектры поглощения, позволяющие использовать один источник излучения для возбуждения КТ с разными оптическими свойствами; высокая фотостабильность и т.д. [12; 13]. Использование КТ для оптического кодирования микрочастиц позволяет одновременно выявлять несколько биомаркеров, повысить фотостабильность и чувствительность диагностической системы, использовать более простое декодирующее оборудование (стандартная комплектация проточного цитометра) и значительно сократить время и стоимость анализа [4; 22]. Кроме того, благодаря своим уникальным спектральным свойствам, КТ могут использоваться как

эффективные доноры энергии при Ферстеровском резонансном переносе энергии (Förster resonance energy transfer, FRET) на подходящий акцептор [12; 18]. Такая возможность позволяет значительно повысить качество выявления маркеров, а также чувствительность и специфичность диагностической системы.

В настоящее время технологии с использованием КТ и микросфер, кодированных флуоресцентными нанокристаллами, находятся на этапе интенсивной разработки для дальнейшей интеграции в клинико-диагностическую практику [1]. Получены первые интересные результаты применения таких суспензионных систем в протеомике для идентификации аутоантител (ауто-АТ) в сыворотке крови [23], что открывает широкие перспективы применения разработанных суспензионных микрочипов для одновременного выявления целого спектра биологических маркеров с высокой точностью и чувствительностью.

Применение в лабораторной клинической диагностике суспензионных микрочипов имеет важное медицинское значение, т.к. подобные системы для многопараметрического анализа образцов биологических жидкостей являются экономичной и эффективной альтернативой традиционным ИФА-системам [8; 14]. Диагностические суспензионные системы на основе микросфер, кодированных КТ, способны во многом превзойти возможности существующих клинико-лабораторных методов как для количественной детекции отдельных растворимых онкомаркеров, так и для сравнительного анализа их профиля и, в конечном счете, для эффективной диагностики онкологических заболеваний.

Целью исследования было разработать универсальную многопараметрическую суспензионную систему нового поколения на основе микросфер, кодированных флуоресцентными нанокристаллами, адаптируемую для анализа профилей различных онкомаркеров, и продемонстрировать принципы ее применения на примере выявления двух форм ПСА – маркера РПЖ в сыворотке крови человека.

Материалы и методы

Синтез и солубилизация флуоресцентных нанокристаллов

Нанокристаллы, или КТ, состава CdSe/ZnS, покрытые гидрофобной оболочкой триоктилфосфиноксида (trioctylphosphine oxide, TOPO), были синтезированы в соответствии с описанными ранее протоколами [20] и имели максимумы флуоресценции на 515 и 581 нм и квантовые выходы 55 % и 70 %, соответственно. Стабильные водорастворимые отрицательно заряженные нанокристаллы были получены путем модификации поверхности КТ низкомолекулярным производным полиэтиленгликоля, содержащим функциональные концевые тиольную и карбоксильную группы (Thermo Fisher Scientific) [21].

Синтез микросфер, оптически кодированных флуоресцентными нанокристаллами

В качестве матрицы для синтеза оптически кодированных микрочастиц использовались карбоксилированные латексные микросферы с диаметром 4,08 мкм (меламин-формальдегидные микрочастицы (MF 4.08 μm), microParticles GmbH, Германия) с отрицательно заряженной поверхностью.

Органические полиэлектролиты противоположного заряда – полиаллиламин гидрохлорид (poly(allylamine hydrochloride), ПАН; Mw ≈ 15000 Да; Sigma-Aldrich) и полистиролсульфонат натрия (poly(sodium 4-styrenesulfonate), PSS; Mw ≈ 70000 Да; Sigma-Aldrich) – попеременно адсорбировались на поверхности стандартных карбоксилированных микросфер, формируя плотную многослойную полимерную оболочку [24]. Индивидуальные одноцветные оптические коды микросфер были получены путем включения в состав формирующейся оболочки водорастворимых КТ с отрицательно заряженной поверхностью [25].

Непосредственно перед процедурой химической конъюгации с биомолекулами флуоресцентные микросферы покрывали дополнительным полимерным слоем полиакрилата натрия (poly(acrylic acid sodium salt), PAA; Mw ≈ 15000; Sigma-Aldrich) для получения микросфер с экспонированными на поверхности карбоксильными группами.

Конъюгация адаптерных молекул с поверхностью флуоресцентных микросфер

Ковалентное связывание функциональных адаптерных молекул белка А (Sigma-Aldrich) с поверхностью кодированных микросфер (из расчета 10–50 мкг на 10⁶ микросфер) осуществлялось с помощью карбодимидного метода химической конъюгации по механизму образования ковалентных связей между карбоксильными группами поверхности полиакрилатного слоя микросфер и экспонированными аминогруппами белка.

После конъюгации с адаптерными молекулами свободную поверхность микросферы блокировали от неспецифического связывания с другими компонентами диагностической системы с помощью инкубации с 1–5%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина или казеина коровьего молока (Sigma-Aldrich).

Иммунодиагностический анализ онкомаркеров с помощью микросфер, кодированных флуоресцентными нанокристаллами

Опухолевые АГ – маркеры РПЖ выявляли путем классического иммуноанализа с помощью технологии «лаборатория-на-микрочастице». Для этого распознающие АТ к свободному или общему ПСА (Fujirebio Diagnostics) связывались с адаптерными молекулами белка А (Thermo Fisher Scientific) на поверхности микросфер, кодированных КТ с максимумами флуоресценции на 515 или 581 нм, соответственно.

Таким образом, микросферы, ковалентно связанные с адаптерными молекулами, последовательно инкубировались с компонентами диагностической системы: распознающим АГ-специфическим моноклональным АТ; выявляемым АГ (одна из форм ПСА); детекторным моноклональным АТ; вторичным биотинилированным поликлональным АТ; конъюгатом стрептавидина с флуорофором, визуализирующим диагностическую систему. Поверхностные детекторные АТ (Fujirebio Diagnostics) были общими для обеих форм ПСА. В качестве вторичных АТ были использованы биотинилированные F(ab)₂-фрагменты поликлональных АТ к Fc-фрагментам мышинных иммуноглобулинов (Sigma-Aldrich).

Полученные комплексы визуализировались с помощью конъюгата стрептавидина с флуоресцентным красителем Tri-COLOR (Invitrogen).

АГ-специфические микросферы были откалиброваны с помощью стандартных растворов, содержащих известные количества рекомбинантного АГ (ПСА) (Abcam) в диапазоне концентраций 0–100 нг/мл для свободного и 0–2000 нг/мл для общего ПСА.

Для анализа клинических образцов АГ-специфические микросферы смешивались в эквивалентных количествах (по 20000 микросфер каждого типа в суспензии объемом 50 мкл для анализа одного образца) и инкубировались с сывороткой крови (50 мкл) здоровых доноров и онкологических пациентов с высоким уровнем ПСА. Точные сывороточные концентрации двух форм ПСА были предварительно определены с помощью стандартного ИФА с использованием диагностических наборов производства Fujirebio Diagnostics. Образцы сыворотки крови здоровых доноров и больных РПЖ были предоставлены Отделением урологии и Отделом клинической иммунологии ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина».

При анализе разработанной суспензионной системы с помощью проточной цитометрии возбуждение флуоресценции КТ и вторичной флуоресцентной метки, визуализирующей иммунные комплексы, осуществлялось с помощью аргонового лазера с длиной волны излучения 488 нм (FACSCantoII, Becton Dickinson). Оптические коды популяций микросфер и флуоресценция вторичной визуализирующей метки регистрировались в стандартных каналах проточного цитометра: FITC (fluorescein) (микросферы, кодированные КТ с максимумом флуоресценции на 515 нм); PE (phycoerythrin) (микросферы, кодированные КТ с максимумом флуоресценции на 581 нм) и PE-Cy5 (phycoerythrin-cyanine 5) (Tri-COLOR, 670 нм). Результаты анализа системы записывались до значения 5000–10000 детектируемых событий на образец и обрабатывались с помощью пакета программ FACSDiva (Becton Dickinson).

Результаты и обсуждение

Синтез микросфер, оптически кодированных флуоресцентными нанокристаллами

С помощью адаптированной процедуры формирования многослойной полимерной оболочки с включением в ее состав флуоресцентных нанокристаллов одного типа были синтезированы популяции одноцветных микросфер диаметром 4,08 мкм с максимумами флуоресценции на 515 или 581 нм, предназначенные для одновременного выявления нескольких онкомаркеров. Анализ микросфер, кодированных КТ, с помощью проточной цитометрии показал, что полученные образцы гомогенны и обладают интенсивной флуоресценцией (рис. 1, А и Б). Оптические коды индивидуальных популяций микросфер, кодированных КТ с различными оптическими свойствами, были визуально различимы в смеси образцов.

Конъюгация адаптерных молекул с поверхностью флуоресцентных микросфер

Для формирования функциональных микросфер и эффективной количественной детекции растворимых онкомаркеров флуоресцентные микросферы были конъюгированы с адаптерными белками (белок А). Бактериальные белки А и G содержат в своей структуре специфические участки, обладающие высоким сродством к Fc-концевым

фрагментам иммуноглобулинов класса G млекопитающих [5]. Рекомбинантные белки A и G широко используются в аффинной хроматографии в качестве аффинного носителя-сорбента, с которым специфически связываются иммуноглобулины G (АГ), для высокоизбирательного выделения моноклональных АГ из разного рода биологических образцов, таких, как культуральная среда, асцитная жидкость и т.д.

Преимущества такого подхода в разработанной диагностической системе заключаются в правильной ориентации АГ-специфических участков молекулы распознающего АГ на поверхности микросферы за счет связывания его Fc-фрагментов с белком-адаптером, что гарантирует формирование полноценных функциональных иммунодиагностических микрочипов для количественного определения маркеров. Использование поверхностных адаптерных белков также обеспечивает принципиальную возможность создания универсальных наборов популяций флуоресцентных микрочастиц, которые можно эффективно комбинировать и адаптировать для анализа различных профилей маркеров.

В качестве вторичных агентов для визуализации детекторных комплексов на поверхности микросфер использовали биотинилированные F(ab)₂-фрагменты поликлональных АГ, специфичные к Fc-фрагментам мышинных иммуноглобулинов, и конъюгат стрептавидина с флуоресцентным красителем Tris-COLOR. Такие АГ лишены своих Fc-фрагментов и не способны связываться непосредственно с адаптерными молекулами белка A, что позволяет значительно снизить ложноположительный неспецифический сигнал. Кроме того, при таком методе анализа оба АГ-специфических АГ из пары оставались интактными, что гарантировало сохранение высокой аффинности и специфичности моноклональных АГ.

Чтобы оценить эффективность конъюгации молекул-адаптеров, микросферы инкубировали с полноразмерными поликлональными АГ, мечеными флуоресцеином (Invitrogen). По интенсивности флуоресценции вторичной метки (флуоресцеина) можно было оценить количество белка A, связывающего Fc-фрагменты меченых полноразмерных АГ, на поверхности микросфер (рис. 1, В). В альтернативном контрольном эксперименте с инкубацией микросфер с F(ab)₂-фрагментами иммуноглобулинов, мечеными флуоресцеином (Sigma-Aldrich), флуоресценция вторичной метки не выявлялась (рис. 1, Г). Это свидетельствует о том, что разработанная система позволяет значительно снизить и даже практически ликвидировать ложноположительный флуоресцентный сигнал неспецифического связывания компонентов иммунодиагностической системы с белком A при использовании вторичного агента на основе F(ab)₂-фрагментов иммуноглобулинов.

По результатам анализа стандартных растворов рекомбинантного АГ были построены калибровочные графики для количественного определения двух форм ПСА в образцах сыворотки крови (рис. 2). Стандартные диагностические системы для выявления ПСА, используемые в клинической лабораторной практике, позволяют определять истинные концентрации маркеров только в узких диапазонах, где интенсивность флуоресценции линейно зависит от их концентрации (0–10 нг/мл для свободного и 0–60 нг/мл для общего ПСА). Для анализа образцов с более высокими уровнями онкомаркеров необходима предварительная подготовка об-

разца с его разведением до концентрации, попадающей в диапазон линейной зависимости. Как видно из рис. 2, в этом отношении разработанная нами суспензионная система микросфер выгодно отличается от ныне существующих: калибровочные графики содержат дискретные линейные участки на всем диапазоне концентраций АГ в калибровочных пробах (0–100 нг/мл для свободного и 0–2000 нг/мл для общего ПСА). Другими словами, разработанная система позволяет определять как низкие, так и очень высокие концентрации онкомаркеров без предварительного разведения образца и избежать появления ложных результатов при возникновении так называемого хук-эффекта, характерного для стандартного твердофазного иммуноанализа на планарных носителях [9].

Для проверки применимости предлагаемой нами диагностической системы в клинических условиях мы проанализировали несколько образцов сыворотки крови больных РПЖ и здоровых доноров женского пола с помощью разработанных суспензионных микрочипов (рис. 3) и сравнили результаты с данными, полученными ранее с помощью стандартного клинико-лабораторного метода ИФА (Fujirebio Diagnostics). При анализе образцов сыворотки здоровых доноров женского пола сигнал связывания вторичной флуоресцентной метки на поверхности АГ-специфических микросфер оставался низким (рис. 3, В) и соответствовал неспецифическому сигналу (PE-Cy5-отрицательная популяция) (рис. 3, Б). После инкубации с сывороткой крови больного РПЖ с установленными высокими уровнями двух форм ПСА эффективность связывания в составе иммунодиагностических микрочипов и интенсивность флуоресценции визуализирующей метки были значительно выше (PE-Cy5-положительная популяция) (рис. 3, Г). Эти результаты свидетельствуют о том, что разработанная суспензионная система на основе микросфер, кодированных КТ, позволяет оценить содержание двух форм ПСА и качественно дифференцировать сыворотку здоровых доноров и больных РПЖ.

Заключение

Современные клинико-лабораторные методы ранней диагностики онкологических заболеваний и выбора стратегии их лечения основаны на определении профиля и количественного содержания известных онкомаркеров в клинических образцах [19]. В большинстве случаев для установления точного диагноза требуется количественное определение целого набора онкомаркеров в одном образце. Традиционные методы твердофазного иммуноанализа на планарных носителях по-прежнему остаются наиболее распространенным диагностическим методом в клинической практике [2]. К сожалению, свойства неподвижной планарной матрицы во многом ограничивают возможности оперативной модификации профиля анализируемых параметров, чувствительность, точность, качество и скорость детекции. Многопараметрические суспензионные микрочипы на основе оптически кодированных микросфер имеют ряд преимуществ по сравнению с классическими планарными биочипами [14]. Для таких систем характерны лучшая кинетика связывания, более широкие диапазоны определяемых концентраций в режиме многопараметрического анализа, принципиальная возможность оперативно увеличения количества выявляемых биомаркеров [1; 8; 22].

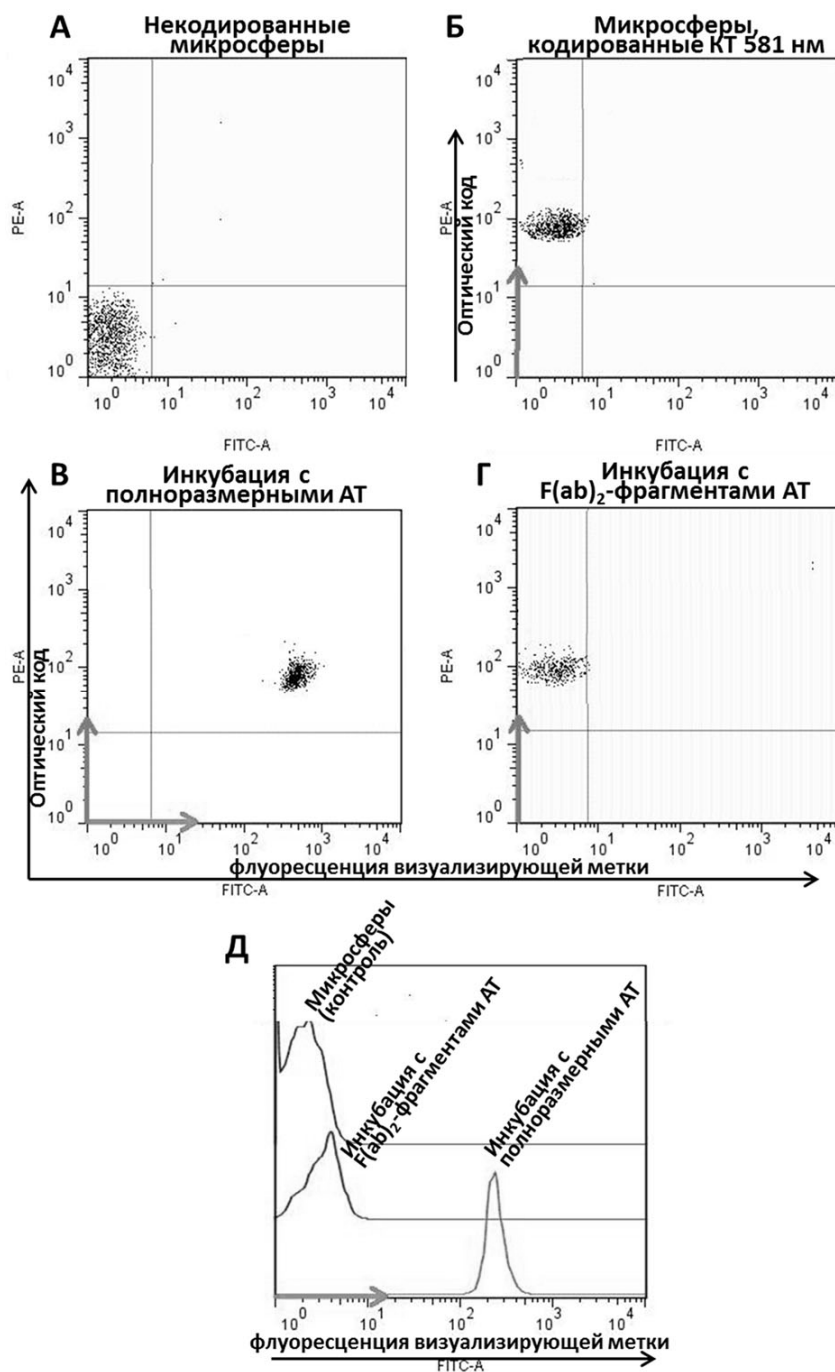


Рис. 1. Контроль эффективности конъюгации адаптерных молекул белка А на поверхности микросфер диаметром 4,08 мкм, кодированных КТ, с помощью проточной цитометрии. Возбуждение флуоресценции КТ и вторичной флуоресцентной метки осуществлялось с помощью аргонового лазера с длиной волны излучения 488 нм:

- карбоксилированные латексные микрочастицы, использованные в качестве матрицы для синтеза микросфер, оптически кодированных КТ (РЕ-отрицательная, FITC-отрицательная популяция);
- микросферы, кодированные КТ с максимумом флуоресценции на 581 нм (РЕ-положительная, FITC-отрицательная популяция);
- микросферы, кодированные КТ с максимумом флуоресценции на 581 нм и конъюгированные с адаптерными молекулами белка А: связывание полноразмерных поликлональных АТ, меченных флуоресцеином (РЕ-положительная, FITC-положительная популяция);
- микросферы, кодированные КТ с максимумом флуоресценции на 581 нм и конъюгированные с адаптерными молекулами белка А: отсутствие связывания F(ab)₂-фрагментов иммуноглобулинов, меченных флуоресцеином (РЕ-положительная, FITC-отрицательная популяция);
- гистограммы распределения интенсивности флуоресценции вторичной метки (флуоресцеин, FITC) в случае связывания меченых полноразмерных антител или отсутствия связывания меченых F(ab)₂-фрагментов иммуноглобулинов с адаптерными молекулами белка А, конъюгированными с поверхностью кодированных микросфер.

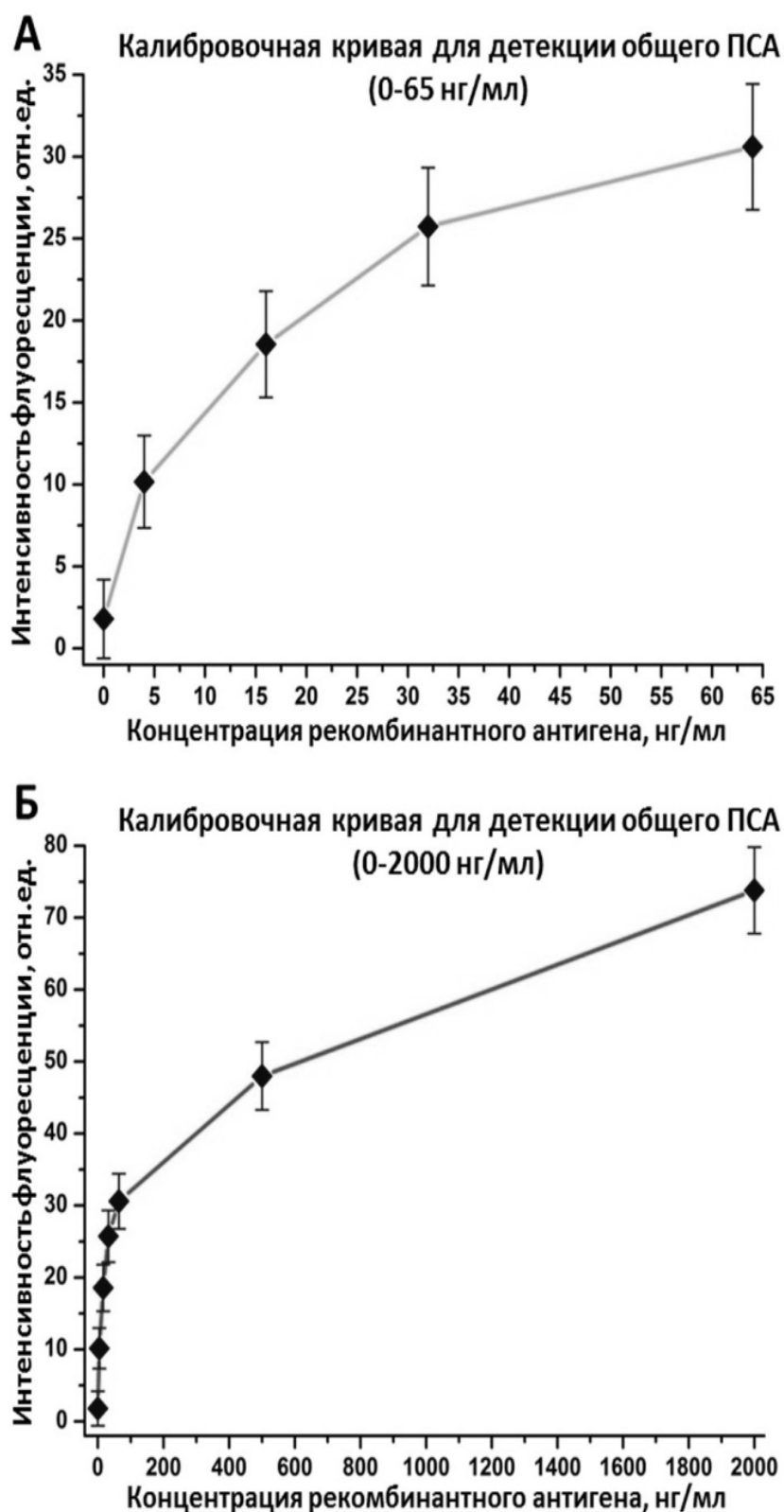


Рис. 2. Калибровочные кривые для количественного определения общего ПСА в образцах сыворотки крови с помощью суспензионной системы флуоресцентных микросфер, построенные по результатам цитометрического анализа калибровочных растворов рекомбинантного АГ. Представлены результаты трех независимых экспериментов:

- калибровочная кривая для количественного определения оПСА в диапазоне 0–65 нг/мл;
- калибровочная кривая для количественного определения оПСА в диапазоне 0–2000 нг/мл.

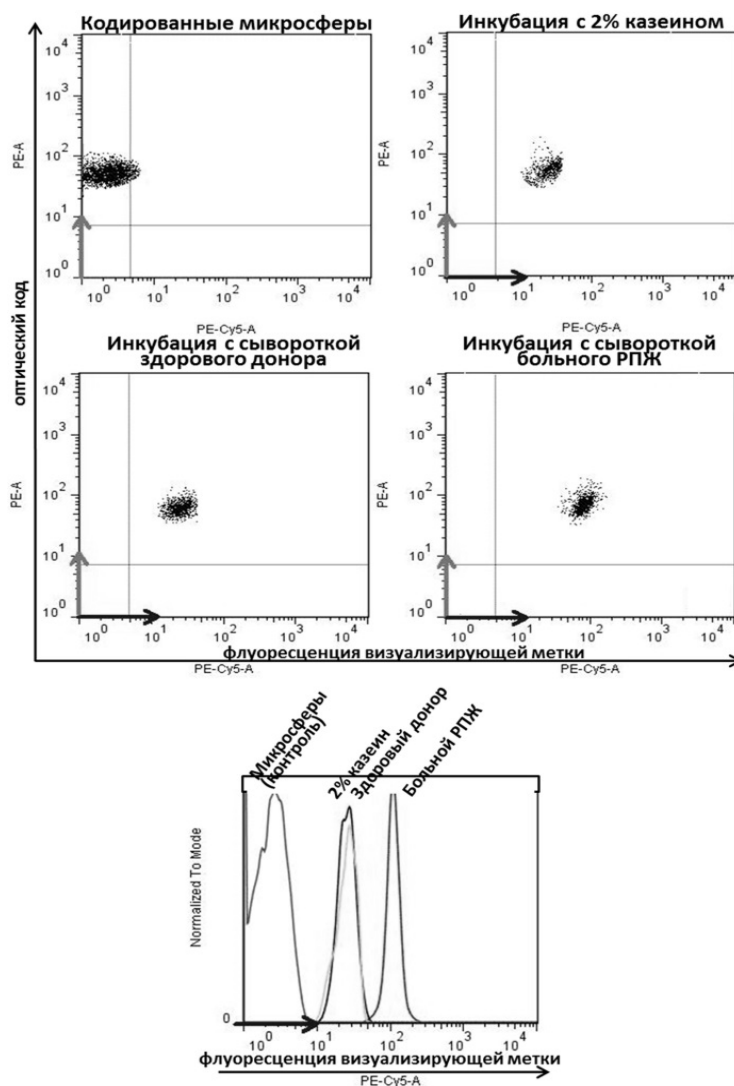


Рис. 3. Выявление оПСА в образцах сыворотки крови с помощью иммунодиагностических микрочипов на основе микросфер, кодированных КТ с максимумом флуоресценции на 581 нм, методом ПЦ:

- флуоресцентные микросферы, кодированные КТ с максимумом флуоресценции на 581 нм (PE-положительная, PE-Cy5-отрицательная популяция, отрицательный контроль);
- флуоресцентные микросферы, проинкубированные с 2%-ным раствором казеина и остальными компонентами микрочипа: минимальное неспецифическое связывание визуализирующего конъюгата стрептавидин–Tricolor (PE-положительная, PE-Cy5-отрицательная популяция);
- флуоресцентные микросферы, проинкубированные с сывороткой крови здорового донора женского пола и остальными компонентами микрочипа: флуоресценция визуализирующей метки на уровне неспецифического сигнала связывания (PE-положительная, PE-Cy5-отрицательная популяция);
- флуоресцентные микросферы, проинкубированные с сывороткой больного РПЖ и остальными компонентами микрочипа: интенсивная флуоресценция визуализирующей метки при связывании онкомаркера (PE-положительная, PE-Cy5-положительная популяция);
- гистограммы распределения интенсивности флуоресценции вторичной метки, визуализирующей специфические иммунные комплексы выявляемого онкомаркера с антителами после инкубации микросфер, кодированных КТ, с образцами сыворотки крови.

В настоящем исследовании мы разработали универсальную многопараметрическую суспензионную систему нового поколения на основе микросфер, кодированных флуоресцентными нанокристаллами, адаптируемую для анализа различных профилей онкомаркеров, и продемонстрировали принципы ее применения на примере выявления двух форм ПСА – маркера РПЖ в сыворотке крови человека. Принцип работы суспензионной системы основан на одновременном выявлении нескольких онкомаркеров, связывающихся с поверхностью АГ-специфических популяций микросфер, обладаю-

щих индивидуальными оптическими кодами, с последующей оценкой интенсивности флуоресценции вторичной метки, визуализирующей диагностические комплексы каждой популяции микросфер методом классической проточной цитометрии. Благодаря адаптерным молекулам белка А, конъюгированным с поверхностью микрочастиц, обеспечивается правильная ориентация и эффективное формирование функциональных диагностических микрочипов, а система может быть легко адаптирована для анализа выбранного профиля специфических онкомаркеров, что свидетельствует о ее универ-

сальности. Разработанная система флуоресцентных микросфер позволяет оценить уровень содержания специфических онкомаркеров и качественно дифференцировать образцы сыворотки здоровых доноров и онкологических пациентов с повышенным содержанием опухолевых АГ.

Суспензионные микрочипы нового поколе-

ния на основе микросфер, кодированных КТ, позволяют проанализировать профиль растворимых онкомаркеров с высокой эффективностью, чувствительностью и скоростью, что, несомненно, будет способствовать своевременной ранней диагностике онкологических заболеваний.

Благодарности

Данная работа финансировалась Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках программы привлечения ведущих ученых в российские образовательные учреждения высшего профессионального образования (проф. Игорь Руфаилович Набиев, грант № 11.G34.31.0050, www.inbe.mephi.ru).

Литература

1. Бражник К.И., Барышникова М.А., Соколова З.А. и др. Новые направления в исследовании и ранней диагностике рака с применением детекционных систем на основе флуоресцентных нанокристаллов // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 3. – С. 11–24.
2. Осипова Т.В., Рябых Т.П., Барышников А.Ю. Диагностические микрочипы: применение в онкологии // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 3. – С. 72–81.
3. Рябых Т.П., Осипова Т.В., Деметьева Е.И. и др. Тест-система в формате биочипа для одновременного количественного определения общей и свободной форм простат-специфического антигена в сыворотке крови // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 2. – С. 49–57.
4. Akinfiyeva O., Nabiev I., Sukhanova A. New directions in quantum dot-based cytometry detection of cancer serum markers and tumor cells // Crit Rev Oncol Hematol. – 2012. – 86(1). – P. 1–14.
5. Bjorck L., Kronvall G. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent // J Immunol. – 1984. – 133. – P. 969–74.
6. Cretich M., Damin F., Pirri G. et al. Protein and peptide arrays: recent trends and new directions // Biomol Eng. – 2006. – 23. – P. 77–88.
7. Czarnik A.W. Encoding methods for combinatorial chemistry // Curr Opin Chem Biol. – 1997. – 1. – P. 60–6.
8. Elshal M.F., McCoy J.P. Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA // Methods. – 2006. – 38. – P. 317–23.
9. Fuzery A.K., Levin J., Chan M.M. et al. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges // Clin Proteomics. – 2013. – 10. – P. 13–27.
10. Han M., Gao X., Su J.Z. et al. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules // Nat Biotechnol. – 2001. – 19. – P. 631–5.
11. Kellar K.L., Iannone M.A. Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays // Exp Hematol. – 2002. – 30. – P. 1227–37.
12. Medintz I.L., Uyeda H.T., Goldman E.R. et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing // Nat Mater. – 2005. – 4. – P. 435–46.
13. Nabiev I., Sukhanova A., Artemyev M. et al. Fluorescent colloidal particles as a detection tools in biotechnology systems / In: Colloidal nanoparticles in Biotechnology (Elissari A ed.). Wiley, London-Singapore-NY, 2006. – P. 133–68.
14. Nolan J.P., Sklar L.A. Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm // Trends Biotechnol. – 2002. – 20. – P. 9–12.
15. Petrik J. Diagnostic applications of microarrays // Transfus Med. – 2006. – 16. – P. 233–47.
16. Pregibon D.C., Toner M., Doyle P.S. Multifunctional encoded particles for high-throughput biomolecule analysis // Science. – 2007. – 315. – P. 1393–6.
17. Resch-Genger U., Grabolle M., Cavaliere-Jaricot S. et al. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels // Nat Methods. – 2008. – 5. – P. 763–75.
18. Shi L., Rosenzweig N., Rosenzweig Z. Luminescent quantum dots fluorescence resonance energy transfer-based probes for enzymatic activity and enzyme inhibitors // Anal Chem. – 2007. – 79. – P. 208–14.
19. Sturgeon C. Practice guidelines for tumor marker use in the clinic // Clin Chem. – 2002. – 48. – P. 1151–9.
20. Sukhanova A., Devy J., Venteo L. et al. Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells // Anal Biochem. – 2004. – 324. – P. 60–7.
21. Sukhanova A., Even-Desrumeaux K., Kisserli A. et al. Oriented conjugates of single-domain antibodies and quantum dots: toward a new generation of ultrasmall diagnostic nanoprobe // Nanomedicine. – 2012. – 8. – P. 516–25.
22. Sukhanova A., Nabiev I. Fluorescent nanocrystal-encoded microbeads for multiplexed cancer imaging and diagnosis // Crit Rev Oncol Hematol. – 2008. – 68. – P. 39–59.
23. Sukhanova A., Susha A.S., Bek A. et al. Nanocrystal-encoded fluorescent microbeads for proteomics: antibody profiling and diagnostics of autoimmune diseases // Nano Lett. – 2007. – 7. – P. 2322–7.
24. Sukhorukov G.B., Donath E., Moya S. et al. Microencapsulation by means of step-wise adsorption of polyelectrolytes // J Microencapsul. – 2000. – 17. – P. 177–85.
25. Susha A.S., Caruso F., Rogach A.L. et al. Formation of luminescent spherical core-shell particles by the consecutive adsorption of polyelectrolyte and CdTe (S) nanocrystals on latex colloids // Colloids Surf. – 2000. – 163(A). – P. 39–44.

СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АГ	антиген
АТ	антитело
ИФА	иммуноферментный анализ
КТ	квантовая точка
ПСА	простатический специфический антиген
oПСА	общий простатический специфический антиген
ПЦ	проточная цитометрия
РПЖ	рак предстательной железы
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FITC	fluorescein isothiocyanate
FRET	Förster resonance energy transfer
MF	melamine formaldehyde
РАА	poly(acrylic acid, sodium salt)
РАН	poly(allylamine hydrochloride)
РЕ	phycoerythrin
РЕ-Сy5	phycoerythrin-cyanine 5
PSA	prostate-specific antigen
PSS	poly(sodium 4-styrenesulfonate)
ТОРО	trioctylphosphine oxide

УДК 535.14:546-022.53+616-006.2-097.1

Р.С. Билан¹, К.И. Бражник¹, П. Шамс², Д. Бату², И.Р. Набиев^{1,3}, А.В. Суханова^{1,3}**ОРИЕНТИРОВАННЫЕ КОНЪЮГАТЫ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОКРИСТАЛЛОВ:****НОВОЕ ПОКОЛЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ НАНОМЕТОК****ДЛЯ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЙ ДЕТЕКЦИИ ОНКОМАРКЕРОВ**¹Лаборатория нано-биоинженерии, Национальный Исследовательский Ядерный Университет «МИФИ», Москва²Исследовательский центр в области канцерологии, INSERM UMR 1068, Марсель, Франция.³Лаборатория по исследованиям в области нанонаук – EA4682, Университет г. Реймс, Шампань-Арденны, Франция**Контактная информация**

Суханова Елена Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нано-биоинженерии

адрес: 115409 Москва, Каширское шоссе, д. 31; тел. +7(967)129-47-87

e-mail: nanomedicine.mephi@gmail.com

Статья поступила 08.09.2014, принята к печати 24.11.2014.

Резюме

Идеальная диагностическая флуоресцентная нанометка должна состоять из нанокристалла с максимально возможной яркостью свечения и высокоспецифичной распознающей молекулы минимально возможного размера. При этом все распознающие молекулы, связанные с поверхностью нанокристалла, должны быть ориентированы одинаковым образом – так, чтобы их центры связывания были доступны для взаимодействия с антигенами и не были блокированы поверхностью нанокристалла.

Яркость полупроводниковых флуоресцентных нанокристаллов «квантовых точек» более чем на порядок превышает яркость лучших органических флуорофоров, они в тысячи раз более фотостабильны и флуоресценция квантовых точек разных цветов может быть возбуждена светом одной длины волны. В тоже время, мономерные однодоменные антитела, наименьшие функциональные единицы антител, производимых камелоидами и акулами, в 12 раз меньше полноразмерных моноклональных антител и, при сравнимой аффинности, отличаются выдающейся стабильностью и способностью к рефолдингу.

В настоящей работе нами получены ориентированные конъюгаты однодоменных антител с водорастворимыми квантовыми точками. Высокая ориентация антител на поверхности нанокристалла была достигнута за счет введения в структуру антител дополнительного С-концевого аминокислотного остатка, с последующим проведением реакции связывания антител с наночастицами именно через этот остаток.

Полученные диагностические метки использованы для высокочувствительной детекции РЭА *in vitro* методом проточной цитометрии. Показана возможность выявления малых количеств РЭА+ клеток линии MC38 (колоректальной аденокарциномы мыши) в смеси с РЭА– клетками. Предполагается, что чувствительность диагностики с использованием созданных нанометок нового поколения может быть существенно повышена за счет оптимизации условий возбуждения их флуоресценции, а возможность одновременного возбуждения флуоресценции нанокристаллов разных цветов позволяет разработать системы высокопроизводительной детекции большого количества онкомаркеров в минимальном объеме сыворотки крови.

Ключевые слова: квантовые точки, однодоменные антитела, раково-эмбриональный антиген, диагностические метки

R.S. Bilan¹, K.I. Brazhnik¹, P. Chames², D. Baty², I.R. Nabiev^{1,3}, A.V. Sukhanova^{1,3}**ORIENTED CONJUGATES OF SINGLE-DOMAIN ANTIBODIES****AND FLUORESCENT NANOCRYSTALS:****A NEW GENERATION OF DIAGNOSTIC NANOPROBES****FOR HIGH-THROUGHPUT DETECTION OF CANCER MARKERS**¹Laboratory of Nano-Bioengineering of National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow²Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, INSERM UMR 1068, Marseille, France³Laboratoire de Recherche en Nanosciences, LRN-EA4682, Université de Reims Champagne-Ardenne, France**Abstract**

An ideal diagnostic fluorescent nanoprobe should comprise a nanocrystal with the highest possible fluorescence brightness and a highly specific capture molecule, which should be as small as possible. Furthermore, all capture molecules linked to the nanocrystal should be so oriented that their antigen-binding centers be accessible for antigens and not blocked by the nanocrystal surface.

The brightness of fluorescence nanocrystals, so-called QDs, is more than an order of magnitude higher than that of the best organic fluorophores; QDs are thousands of times more photostable; and fluorescence of QDs of different colors can be excited by light of the same wavelength. The monomeric single-domain antibodies (sdAbs), the smallest known antigen-recognizing molecules, which are derived from immunoglobulins of camelids and sharks, are 12 times smaller than full-size antibodies while preserving about the same affinity for antigens. They are also extremely stable and capable of refolding.

We have obtained oriented conjugates of sdAbs with water-soluble QDs. The desirable orientation of sdAbs relative to the nanocrystal surface was ensured by adding an amino acid residue to the C-end of the antibody peptide chain and subsequently linking the antibody to the nanocrystal through this residue.

The resultant diagnostic probes have been used for highly sensitive detection of CEA *in vitro* by means of flow cytometry. This technique has been demonstrated to detect minor amounts of CEA⁺ MC38 cells in a mixture with CEA⁻ cells. There are grounds to believe that the sensitivity of diagnosis using the novel nanoprobe can be substantially enhanced by optimizing the mode of excitation of their fluorescence. The possibility to simultaneously excite fluorescence of QDs of different colors allows systems for high-throughput detection of multiple cancer markers in a single, small serum sample to be developed.

Key words: quantum dots, single-domain antibodies, carcinoembryonic antigen, diagnostic probes.

Введение

КТ – новый класс флуорофоров, которые представляют собой неорганические нанокристаллы размером 2–10 нм, состоящие из полупроводникового ядра и оболочки, защищающей его от окисления [10]. В отличие от органических флуорофоров, традиционно используемых в клинической диагностике, КТ обладают рядом преимуществ: они имеют узкий, симметричный спектр эмиссии и широкий спектр возбуждения, что позволяет использовать один источник излучения для одновременного возбуждения флуоресценции КТ разных цветов. Очевидно, что подобные свойства позволяют одновременно выявить несколько биомаркеров в одном образце, используя для их визуализации КТ разных цветов [1]. КТ обладают также уникальными фотохимическими свойствами: интенсивность их флуоресценции более чем в сто раз, а фотостабильность в несколько тысяч раз выше, чем органических флуорофоров [11]. Для применения КТ в биологических и медицинских целях [2; 9] их поверхность модифицируют с тем, чтобы придать им стабильность в водных средах и биологических жидкостях и тканях. При этом для формирования дополнительной полярной оболочки на поверхности КТ используют соединения, содержащие различные функциональные группы (как правило, гидроксильные, карбоксильные или аминогруппы), что позволяет варьировать заряд поверхности полученных частиц, а также осуществлять их химическую сшивку с различными биологическими распознающими молекулами – белками, пептидами, олигонуклеотидами. Такой подход позволяет получать диагностические флуоресцентные нанометки, обладающие чрезвычайно высокими яркостью и фотостабильностью. Кроме того, разработанные методы конъюгации КТ с антителами позволяют получить целый набор меток для выявления множества антигенов.

За последние 15 лет непрерывно расширяется применение биоконъюгатов КТ в качестве диагностических меток в иммуногистохимических и цитохимических исследованиях [5; 6]. Как правило, для этих целей применяют конъюгаты КТ с моноклональными антителами или стрептавидином в комбинации с биотинилированными антителами. Большинство авторов отмечают, что использование КТ позволяет добиться большей чувствительности по сравнению со стандартными методами иммуноокрашивания [12;13].

Настоящая работа посвящена получению и применению в цитометрических исследованиях компактных диагностических меток на основе конъюгатов КТ с одАт – так называемыми «наноконъюгатами», специфичными к РЭА. Такие антитела представляют собой варибельные домены неканонических двухцепочечных антител (рис. 1), которые вырабатываются в организмах некоторых видов животных (представителей семейства верблюдовых). Неканонические антитела состоят только из двух тяжелых цепей, в отличие от полноразмер-

ных иммуноглобулинов, в состав которых входят две тяжелые и две легкие цепи [4]. Антигенсвязывающий участок таких антител состоит из одного варибельного домена VhH и представляет собой наименьший из известных на сегодняшний день фрагментов, обладающих функциональной активностью антител. ОдАтОдАт получают генно-инженерным методом на основе последовательности варибельных доменов неканонических антител. В отличие от обычных моноклональных антител с молекулярной массой порядка 150 кДа, одАт имеют молекулярную массу всего около 13 кДа и состоят из приблизительно 110 аминокислотных остатков. При таком компактном размере одАт имеют высокие стабильность и растворимость, они полностью сохраняют функциональную активность полноразмерных антител и способны связываться с эпитопами, стерически недоступными для полноразмерных антител. В данной работе для получения компактных диагностических меток были использованы модифицированные одАт, содержащие С-концевой остаток цистеина, который позволил конъюгировать антитела с поверхностью КТ в строго заданной ориентации, не затрагивая участок связывания антигена. Метод ориентированной конъюгации одАт на поверхности КТ позволил получить компактные сверхяркие диагностические метки, которые были использованы для цитометрических исследований.

Материалы и методы

Получение и очистка

рекомбинантных однодоменных антител

РЭА-специфичные одАт С17 были получены путем иммунизации ламы. Клоны РЭА-специфичных одАт были отобраны из библиотек одАТ, полученных после иммунизации. Гены одАт были субклонированы в плазмидный вектор рЕТ, содержащий фрагмент ДНК, кодирующий шесть остатков гистидина, для экспрессии в клетках бактерий *Escherichia coli* штамма BL21-DE3 и дальнейшего выделения одАт с помощью хроматографии на колонке с никель-агарозой. Плазмидные конструкции рЕТ одАт-С17-his6Cys были получены введением дополнительного фрагмента ДНК, кодирующего аминокислоту цистеин с помощью стандартных генно-инженерных методов. Специфическая интеграция одиночного аминокислотного остатка цистеина на С-конце молекул рекомбинантных одАт-Сys позволяет получить ориентированное расположение молекул одАт на поверхности КТ после конъюгирования.

Бактериальные клетки, трансформированные плазмидными конструкциями, выращивали в течение ночи при 37 °С и постоянном перемешивании в 10 мл среды 2 YТ, содержащей 16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 85 мМ хлорида натрия, 2 % глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина. Полученную ночную культуру бактериальных клеток разводили в 400 мл свежей среды 2 YТ и растили до момента, когда оптическая плотность (OD₆₀₀) становилась равной 0,5.

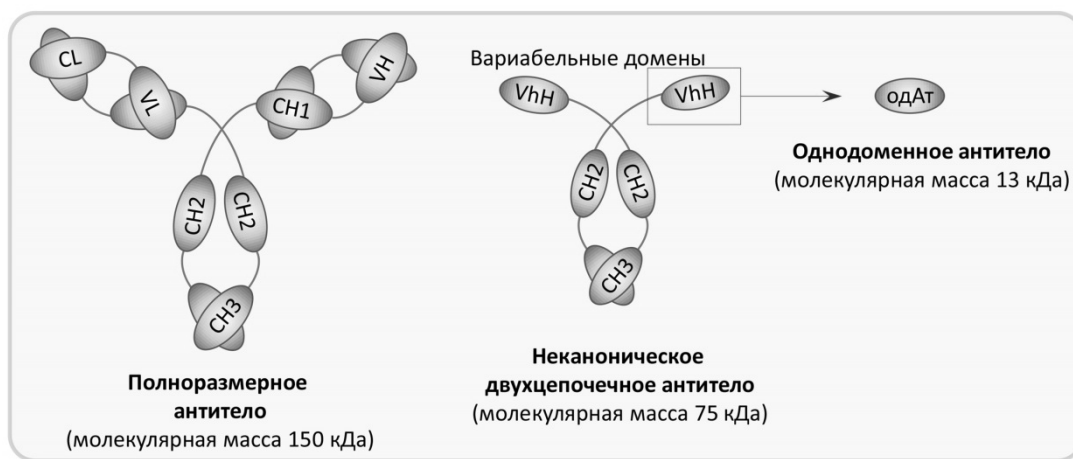


Рис. 1. Строение полноразмерных антител, состоящих из двух тяжелых и двух легких цепей, и неканонических двухцепочечных антител, которые состоят из двух тяжелых цепей. Антиген-связывающий участок полноразмерных антител состоит из двух переменных доменов тяжелых и легкой цепей; у неканонических антител этот участок состоит только из одного переменного домена (VhH). Однодоменные антитела, получаемые из неканонических антител, являются наименьшими структурными единицами, обладающими полноценной функциональной активностью антитела.

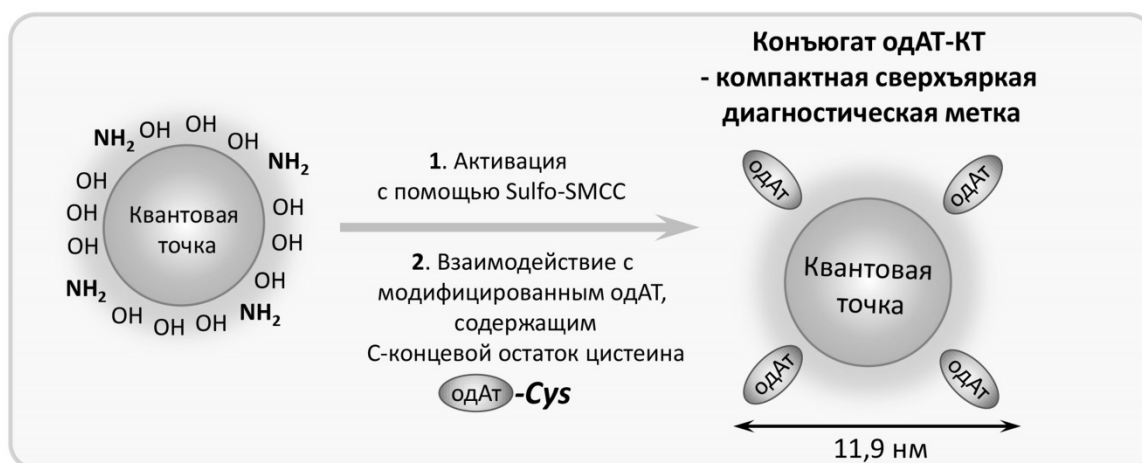


Рис. 2. Схема получения конъюгатов квантовых точек с рекомбинантными однодоменными антителами, модифицированными путем введения дополнительного остатка цистеина на С-конце аминокислотной последовательности.

Экспрессию одАТ-Cys индуцировали добавлением 0.1 мМ изопропил β -D-1-тиогактопиранозид, и инкубировали клетки при 30 °С и постоянном перемешивании в течение 20 ч.

Клетки собирали центрифугированием, клеточный осадок замораживали на 20 мин при –80 °С и затем лизировали добавлением реагента для экстракции белков BugBuster® (Novagen) на 20 мин при мягком перемешивании.

После этого одАТ выделяли с помощью хроматографии на колонке с никель-агарозой (Clontech) согласно протоколу производителя. После очистки одАТ-Cys концентрировали в натрий-фосфатном буфере, содержащем 137 мМ хлорида натрия (рН 7,2), с помощью центрифужных концентраторов Амикон Ультра 5000 MWCO. Степень очистки одАТ-Cys определяли с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия. Концентрацию белка определяли спектрометрически. Полученные высокоочищенные препараты одАТ-Cys с концентрацией белка 5 мг/мл хранили при –20 °С.

Оценка специфической активности полученных партий одАТ проводилась с помощью стандартных иммуотестов (иммуноблоттинг).

Конъюгация антител с квантовыми точками

Для получения конъюгатов были использованы КТ с максимумом эмиссии флуоресценции при 570 нм, сольбилизованные в водном растворе с помощью DL-цистеина и поверхность которых была модифицирована с использованием низкомолекулярных производных ПЭГ с концевыми сульфгидрильными (SH) и гидроксильными (OH) или аминогруппами (NH₂) в молярном соотношении (SH-ПЭГ-OH):(SH-ПЭГ-NH₂) = 9:1 [9].

Конъюгацию с одАТ проводили согласно методике, описанной в [9]. Квантовые точки разводили в 0,1 М фосфатном буферном растворе (рН 7,2) до концентрации 4 мг/мл. Затем к раствору КТ добавляли 100-кратный молярный избыток бифункционального сшивающего агента Sulfo-SMCC и

инкубировали при комнатной температуре в течение часа при постоянном перемешивании. После окончания активации КТ очищали от избытка Sulfo-SMCC на хроматографической колонке с Сефадексом G-25, уравновешенной 0,1 М фосфатным буферным раствором (рН 7,2).

Затем очищенные активированные КТ смешивали с одАт в молярном соотношении 1:10 и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Полученные конъюгаты очищали методом гелефильтрационной хроматографии на колонке с Суфердексом G200, уравновешенной 0,1 М фосфатным буфером (рН 7,2).

Количественно соотношение одАт и КТ в полученных конъюгатах оценивали спектрофотометрически; содержание антител в пробе определяли при помощи стандартного набора реагентов (реакция Бредфорда), содержание КТ в пробе – по спектру поглощения, используя значение коэффициента молярного поглощения на первом экситонном максимуме поглощения. Полученное соотношение одАт и КТ в конъюгатах составило приблизительно 4 : 1.

Размеры КТ и конъюгатов КТ–одАт измеряли методом динамического рассеяния света с помощью анализатора размера наночастиц Zetasizer Nano ZS (Malvern).

Клеточные культуры

Линию клеток колоректальной аденокарциномы мыши MC38 культивировали в среде Dulbecco's Modified Eagle Medium glutamax media (Invitrogen) с добавлением 10% ТЭС, инактивированной нагреванием (BioWhittaker), и антибиотиков: пенициллина (1000 ед./мл), стрептомицина (1000 мкг/мл), фунгизина (2,5 мкг/мл). Клеточную линию MC38-РЭА, экспрессирующую РЭА, культивировали в тех же условиях в среде с добавлением G418 (Sigma-Aldrich).

Окрашивание клеток при помощи конъюгатов КТодАт и цитометрический анализ

Конъюгаты КТодАт разводили в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем 5% БСА, до концентрации 30 мкг/мл. Клетки MC38 и MC38-РЭА суспендировали, и готовили смесь клеток с содержанием MC38-РЭА1% и MC38 99%. Затем к общему количеству 100 000 клеток добавляли по 50 мкл растворов конъюгатов КТ–одАт и инкубировали в течение 90 мин при +4 °С в темноте. Затем производили отмывку фосфатным буферным раствором, содержащим 5 % БСА. Сразу же после последней стадии отмывания определяли соотношение окрашенных и неокрашенных клеток в смеси. Цитометрический анализ флуоресцентно окрашенных клеток проводили с помощью проточного цитометра FACStar Plus (Becton Dickinson). Для возбуждения флуоресценции КТ использовали аргоновый лазер с длиной волны излучения 488 нм, сигнал анализировали в диапазоне 564–586 нм. Интенсивность окрашивания клеток в каждом из анализируемых образцов оценивали по значению медианы флуоресцентного сигнала.

Результаты и обсуждение

Получение и характеристика конъюгатов КТ–одАт

Квантовые точки, представляющие собой нанокристаллы CdSe, покрытые оболочкой из ZnS,

были синтезированы в органической среде, сольбулизированы (для перевода в водный раствор) путем замены гидрофобных лигандов на поверхности КТ на DL-цистеин. Затем молекулы цистеина замещали смесью тиол-содержащих низкомолекулярных производных ПЭГ с концевыми гидроксильными (ОН) или аминогруппами (NH₂) в молярном соотношении (SH-ПЭГ-ОН):(SH-ПЭГ-NH₂) = 9 : 1 [9]. Таким образом, были получены стабильные в водных растворах компактные КТ с гидродинамическим диаметром около 9 нм и квантовым выходом около 90 %. На поверхности таких КТ экспонированы функциональные группы, определяющие стабильность КТ при различных рН. Варьируя состав производных ПЭГ при сольбулизации КТ, можно регулировать поверхностный заряд получаемых частиц и подбирать оптимальное соотношение функциональных групп для дальнейшей конъюгации (ковалентной иммобилизации) антител на поверхности КТ.

При получении диагностических меток на основе конъюгатов КТ с антителами решающими условиями являются:

- 1) сохранение биологической активности и стабильности антитела в результате конъюгации;
- 2) оптимальное количественное соотношение КТ и антитела в составе конъюгата;
- 3) надлежащая ориентация антител на поверхности КТ, с тем чтобы функционально активные сайты были экспонированы наружу и доступны для связывания с антигеном.

Для иммобилизации биологических молекул (в частности, антител) на поверхности наночастиц широко используют стандартные методы карбодимидной химии. Как правило, ковалентная иммобилизация осуществляется за счет взаимодействия первичной аминогруппы антитела с карбоксильными группами на поверхности частицы, предварительно активированными с помощью водорастворимого карбодимида. Этот метод имеет ряд ограничений. Во-первых, интермедиаты, образующиеся при активации гидроксильных групп с помощью карбодимида, нестабильны в водных средах и подвергаются быстрому гидролизу, поэтому необходимо использовать большие избытки карбодимида. Во-вторых, взаимодействие аминогрупп антитела с активированными карбоксильными группами КТ происходит случайным образом и может привести к большому числу нежелательных сшивок и потери аффинности антитела. В-третьих, из-за большого числа аминогрупп, экспонированных на поверхности антитела, его ориентация на поверхности происходит случайным образом, что приводит к стерической недоступности определенной доли центров связывания антигена.

Выпускаемые компанией Invitrogen метки на основе антител, связанных с КТ, получают конъюгацией КТ с фрагментами антител, образующихся в результате частичного восстановления дисульфидных связей полноразмерного антитела. При надлежащих условиях восстановления, в результате такой реакции получают два фрагмента антител, каждый из которых состоит из одной тяжелой и одной легкой цепей. Конъюгация происходит через тиольные группы восстановленных фрагментов антител. Однако функциональная активность восстановленных таким образом фрагментов антител может быть существенно снижена за счет нарушения целостности антиген-связывающих сайтов, образованных переменными доменами тяжелой и легкой цепей.

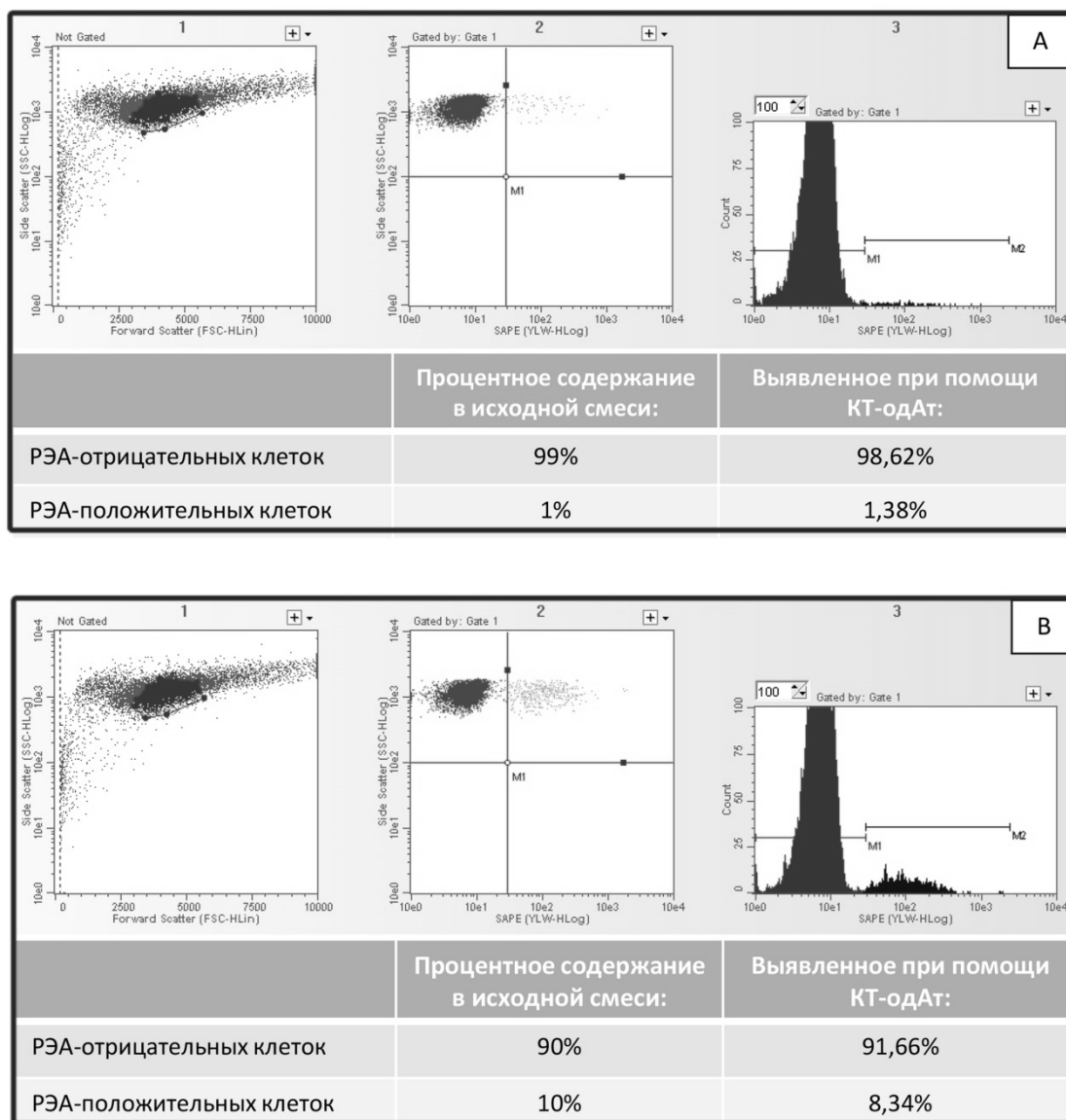


Рис. 3. Проточная цитометрия смесей клеток MC38-РЭА и MC38. 100 000 клеток инкубировали с КТ-одАт в течение 90 мин при +4°C в темноте. Сразу же после последней стадии отмывания определяли соотношение окрашенных и неокрашенных клеток в смеси с помощью проточной цитометрии.

- с процентным содержанием MC38-РЭА 1%
- MC38 99% и MC38-РЭА 10% и MC38 90%

Так, было обнаружено, что количество функционально активных антител в составе полученных таким образом серийно производимых конъюгатов составляет всего лишь $0,076 \pm 0,014$ антител/КТ, в то время как большая часть антител теряет свою активность вследствие чрезмерного восстановления [7].

В данной работе был разработан метод ориентированной конъюгации одАт на поверхности КТ, который позволяет сохранить биологическую активность антител и задать их строгую ориентацию на поверхности КТ (рис. 2). Модифицированные одАт к РЭА были получены генно-инженерными методами путем введения дополнительного остатка цистеина на С-конце аминокислотной последовательности. Для конъюгации с КТ был использован бифункциональный сшивающий агент сульфо-сульфосукцинимидил-4-[N-малеимидометил] циклогексан-1-карбоксилат (Sulfo-SMCC), имеющий две реакционно-способные группы; одна из них (N-оксисукцинимидный эфир) активна в отношении пер-

вичных аминогрупп на поверхности КТ, а вторая (малеимидная группа) связывается с тиольной группой цистеина в составе модифицированного одАт. Сначала проводили реакцию взаимодействия Sulfo-SMCC с аминокислотными группами в составе оболочки КТ, после чего активированные КТ очищали от избытка реагента методом гель-проникающей хроматографии. Затем к КТ добавляли одАт, в результате чего тиольные группы в составе одАт связывались с поверхностью КТ, активированных с помощью Sulfo-SMCC. За счет того, что в состав модифицированных одАт была введена всего одна тиольная группа, присоединение одАт происходило только через С-концевой аминокислотный остаток антител. В результате все молекулы одАт, ковалентно связанные с поверхностью КТ, строго ориентированы относительно поверхности КТ, что сохраняет активность распознающего центра, экспонированного в окружающую среду. Молярное соотношение одАт:КТ в конъюгате подсчитывали,

определяя содержание белка методом Бредфорда и подсчитывая концентрацию КТ, зная коэффициенты экстинкции КТ для первого экситона. Это соотношение оказалось примерно 4 одАт на КТ (одАт:КТ = 4 : 1).

Измерения с использованием метода ДРС показали, что конъюгация КТ с одАт-Cys позволяет получить исключительно компактные диагностические метки. Гидродинамические диаметры конъюгатов КТ–одАт (11,9 нм) лишь немного больше, чем диаметры неконъюгированных КТ (8,84 нм) и гораздо меньше, чем размеры серийно выпускаемых конъюгатов КТ–IgG (30,3 нм).

Использование конъюгатов КТ–одАт в проточной цитометрии

Эксперименты по иммунодетекции с помощью метода проточной цитометрии продемонстрировали, что конъюгаты КТ–одАт специфически связывают РЭА – рецептор клеточной поверхности, который экспрессирует значительная часть опухолевых клеток человека (рис. 3). Проточная цитометрия смесей клеток МС38-РЭА и МС38 в различных соотношениях (процентное содержание РЭА-положительных клеток в смеси варьировалось от 100% до 1%), окрашенных конъюгатами КТ–одАт, показала тесную корреляцию между числом клеток, идентифицированных как РЭА+, и действительным количеством РЭА+ клеток: даже 1% РЭА+ клеток легко выявлялся на фоне 99%

РЭА– клеток (рис. 3). Это подтверждает высокую специфичность и чувствительность выявления РЭА-эксперес-сирующих клеток с помощью конъюгатов КТ–одАт методом проточной цитометрии.

Заключение

Метод ориентированной конъюгации, разработанный в данном исследовании, позволяет химически иммобилизовать одАт на поверхности КТ без потери функциональной активности антител таким образом, что практически все центры связывания антигена экспонированы в окружающей среде. Полученные диагностические метки на основе конъюгатов КТ–одАт имеют крайне малый размер: их гидродинамический диаметр составляет 11,9 нм, что значительно меньше используемых в настоящее время конъюгатов полно-размерных антител с КТ. В среднем, с каждой КТ конъюгированы одАт4 молекулы одАт.

Полученные диагностические метки применяли для иммунодетекции РЭА-положительных клеток методом проточной цитометрии. Показана высокая чувствительность меток: они позволяют выявить РЭА-положительные клетки, даже если их содержание в клеточной популяции составляет всего 1%. Данный подход можно применять для высокоточной детекции других онкомаркеров, например, рецепторов эпидермального фактора роста, методом проточной цитометрии.

Благодарности

Данная работа финансировалась Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках программы привлечения ведущих ученых в российские образовательные учреждения высшего профессионального образования (проф. Игорь Руфаилович Набиев, грант № 11.G34.31.0050, www.lnbe.mephi.ru).

Литература

1. Бражник К.И., Барышникова М.А., Соколова З.И. и др. Новые направления в исследовании и ранней диагностике рака с применением детекционных систем на основе флуоресцентных нанокристаллов // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 3. – С. 11–24.
2. Akinfiyeva O., Nabiev I., Sukhanova A. New directions in quantum dots-based flow cytometry detection of cancer serum markers and tumor cells // Critical Reviews in Oncology/Hematology. – 2013. – 86(1). – P. 1–14.
3. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S. et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains // Nature. – 1993. – 363. – P. 446–8.
4. Li Z.H., Peng J., Chen H.L. Bioconjugated quantum dots as fluorescent probes for biomedical imaging // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. – 2011. – 11(9). – P. 7521–36.
5. Liu X.L., Peng C.W., Chen C., et al. Quantum dots-based double-color imaging of HER2 positive breast cancer invasion // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2011. – 409(3). – P. 577–82.
6. Pathak S., Davidson M.C., Silva G.A. Characterization of the functional binding properties of antibody conjugated quantum dots // Nano Letters. – 2007. – 7. – P. 1839–45.
7. Rousserie G., Sukhanova A., Even K. et al. Semiconductor quantum dots for multiplexed bio-detection and cancer diagnosis on solid-state microarrays // Critical Reviews in Oncology/Hematology. – 2010. – 74. – P. 1–15.
8. Samokhvalov P., Artemyev M., Nabiev I. Basic principles and current trends in colloidal synthesis of highly luminescent semiconductor nanocrystals // Chemistry - A European Journal. – 2013. – 19(5). – P. 1534–46.
9. Sukhanova A., Devy J., Venteo L. et al. Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells // Analytical Biochemistry. – 2004. – 324(1). – P. 60–7.
10. Xing Y., Smith A.M., Agrawal A. et al. Molecular profiling of single cancer cells and clinical tissue specimens with semiconductor quantum dots // International Journal of Nanomedicine. – 2006. – 1(4). – P. 473–81.
11. Zrazhevskiy P., Gao X. Quantum dot imaging platform for single-cell molecular profiling // Nat. Commun. – 2013. – 4. 1619.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

КТ	квантовая точка
одАт	однодоменное антитело
РЭА	раково-эмбриональный антиген
Sulfo-SMCC	сульфо-сульфосукцинимидил-4-[N-малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат
QDs	quantum dots

УДК 616-006.81-033.2:576.367:575.224

О.О. Рябая^{1,2}, Т.А. Сидорова¹, А.Н. Иншаков¹, Э.Ш. Соломко¹, Е.В. Степанова¹
**МОДУЛЯЦИЯ АУТОФАГИИ ВЛИЯЕТ НА ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ПАКЛИТАКСЕЛА
НА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO***

¹ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва²ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва**Контактная информация:**

Оксана Олеговна Рябая, младший научный сотрудник лаборатории биомедицинских исследований НИИ ЭДнТО

Адрес: 115478 Москва, Каширское шоссе, д. 24; тел. +7(499)612-86-70

e-mail: oxa2601@yandex.ru

Статья поступила 17.11.2014, принята к печати 24.11.2014.

Резюме

ММ характеризуется низкой чувствительностью к химио- и биотерапии вследствие высокой резистентности к апоптозу. Мы оценили значимость модуляции аутофагии (блокирования или индукции) для изменения цитотоксичности паклитаксела клеточных линиях ММ с разным статусом гена *B-RAF in vitro*. Мутации в гене *B-RAF* определяют уровень аутофагии в клетках ММ *in vitro*. *B-RAF*^{V600}-линии были резистентны к действию паклитаксела, однако их комбинация с хлорокином синергично увеличивала цитотоксичность препарата. Хотя *B-RAF*^{WT}-клетки ММ были более чувствительны к паклитакселу, добавление ингибитора не влияло на гибель клеток. Изучение механизмов феномена показало вовлечение апоптоза.

Ключевые слова: метастатическая меланома, аутофагия, апоптоз, химиорезистентность, генетические мутации.

О.О. Ryabaya^{1,2}, A.N. Inshakov¹, T.A. Sidorova¹, E.Sh. Solomko¹, A.V. Egorova², E.V. Stepanova¹
**MODULATION OF AUTOPHAGY AFFECTS CYTOTOXICITY OF PACLITAXEL
ON CUTANEOUS MELANOMA CELL LINES OF SKIN IN VITRO**

¹FSBSI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow²FBSU Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow**Abstract**

MM is characterized by low sensitivity to chemotherapy and biotherapy because of its high resistance to apoptosis. We evaluated the significance of the autophagy modulation (blocking or induction) cytotoxicity change of Paclitaxel on 11 cell lines of MM with different *B-RAF* gene status *in vitro*. Cytotoxicity was determined by MTT assay, cell death by flow cytometry. Detection of mRNA expression *Becclin1* performed by RT-PCR. Mutations in the *B-RAF* gene determine the level of autophagy in MM cells *in vitro*. *B-RAF*^{V600} lines were resistant to Paclitaxel and autophagy inhibition by chloroquine increased cytotoxicity of the taxane up to 40-50%. Although *B-RAF*^{WT} MM cells were more sensitive to Paclitaxel, the addition of inhibitor had no effect on cell death. Investigation of the mechanisms of the phenomena showed the involvement of apoptosis process.

Key words: metastatic melanoma, autophagy, apoptosis, chemoresistance, genetic mutations.

Введение

Метастатическая меланома кожи является одним из наиболее агрессивных типов злокачественных опухолей с неблагоприятным прогнозом течения болезни. По прогнозу всемирной организации здравоохранения в ближайшее десятилетие заболеваемость меланомой кожи возрастет на 25 % [5; 14]. Смертность от меланомы остается на высоком уровне, что связано с высоким метастатическим потенциалом опухоли, диагностикой заболевания на поздних стадиях и низкой эффективностью противоопухолевой терапии. Лечение метастатических меланом с использованием стандартных режимов химиотерапии и биотерапии остается недостаточно эффективным, несмотря на появление новых таргетных препаратов. Паклитаксел – цитостатический препарат, относящийся к таксанам, часто используется в комбинациях для лечения метастатической меланомы. Препарат связывается с тубулином, ингибируя деполимеризацию, что приводит к блокированию деления клеток на стадии митоза и интерфазы. Также паклитаксел активирует апоптотическую программу гибели кле-

ток. Однако эффективность современных режимов химиотерапии при метастатической меланоме остается низкой: частота частичных ремиссий составляет всего 15–20 % [17], а медиана общей выживаемости больных – 6 мес [7].

Прорывом в лечении диссеминированной меланомы кожи стало создание препаратов, направленных на инактивацию белка B-RAF, мутации в кодирующем гене которого встречаются у 40–60 % пациентов [11]. Белок B-RAF – серин/треониновая протеинкиназа – является одной из важных сигнальных молекул клетки, которая участвует в передаче сигнала от рецепторов фактора роста RAS через MEK- и ERK-киназы, способствуя пролиферации клеток меланомы и их резистентности к апоптозу [13]. Наиболее частой мутацией в гене *B-RAF* является мутация V600E (80 %), когда происходит замена аминокислот валин на глутамин. Также встречаются мутации V600K (5–20 % случаев), V600R (1–3 %), V600D (<1 %), V600M (<1 %) и не V600 мутации (2 %) [1].

Аутофагия – эволюционно сложившийся процесс внутрилизосомальной утилизации цитозольных белков, макромолекул, органелл и белко-

вых агрегатов. Аутофагия активируется в ответ на целый ряд стимулов, включая недостаток питательных веществ, гипоксию и активацию онкогенов. Изменения в сигнальных путях, связанных с аутофагией, часто встречаются при злокачественных новообразованиях и многих других заболеваниях [2; 21].

Роль B-RAF в регуляции аутофагии является спорной и зависит от типа злокачественного новообразования; сигнализация ERK связана с образованием аутолизосом [10] и гибелью клеток путем аутофагии [9].

Ранее Jane L. Armstrong с соавт. показали, что клеточные линии меланомы с мутацией в B-RAF (B-RAF^{V600E}) дефектны в отношении аутофагии [8]. Несмотря на то, что клетки с мутированным типом гена имеют более высокий уровень базальной аутофагии, чем клетки “дикого” типа, дальнейшая активация аутофагии происходит только в клетках B-RAF^{WT} [6].

Роль аутофагии в качестве альтернативного механизма клеточной смерти в последние годы была предметом активных дискуссий. Выявление аутофагосом с отличными от апоптоза признаками в гибнущих клетках заставило ученых предположить, что она может участвовать в гибели клеток [18]. Однако, в большинстве случаев, аутофагия рассматривается как механизм выживания опухолевых клеток, который может откладывать запуск апоптоза, поддерживать метаболизм в условиях пищевого стресса и снижать повреждение клеток путем предотвращения накопления поврежденных белков и органелл. Вовлечение аутофагии в механизмы гибели опухолевых клеток при раке молочной железы было показано также и для паклитаксела. Паклитаксел ингибирует аутофагию путем блокирования активации PI3K 3 класса и Vps34 – основного участника образования аутофагосом [20].

Аутофагию можно рассматривать как новую мишень для терапии меланомы. Сигнальные молекулы, вовлеченные в процесс аутофагии, могут быть использованы в качестве потенциальных биомаркеров для определения прогноза течения опухолевого заболевания, предсказания эффективности противоопухолевой терапии и выбора рационального лечения для каждого конкретного больного. Активно ведется поиск новых противоопухолевых препаратов, модулирующих аутофагию, для повышения эффективности химиотерапевтического лечения онкологических больных.

В ходе данной работы нами проведено исследование механизмов гибели клеток метастатической меланомы с разным статусом гена B-RAF под действием паклитаксела, в том числе – при комбинации его модуляторами аутофагии.

Материалы и методы

Реактивы

TRIZol-реагент («Sigma», США), агароза квалификации «Biothech grade» (Хеликон, Россия); бромистый этидиум (Serva, Германия); изопропиловый спирт, МТТ («ICN Biomedicals, США»), ДМСО («Sigma», США). M-MuLV обратная транскриптаза RevertAid, Taq-полимераза, реакционные буферы, маркеры молекулярной массы ДНК с длиной фрагментов 100 п.н. (все – Fermentas, Литва); смесь дезоксинуклеотидов (Хеликон, Россия); гексамеры, праймеры для генов бета-актин (*β-Actin*, ACT) и Beclin 1 синтезированы в фирме Литех (Россия).

Препараты

Хлорокин дифосфат (Sigma, США) разводили в дистиллированной воде до 30 мМ (стоковый раствор). Рамамицин (Sigma, США) разводили в ДМСО до стоковой концентрации 27,4 мкМ. Стоковые растворы хранили при –20 °С. Паклитаксел (Таксол, Bristol-Myers Squibb, Великобритания) готовили *ex tempore*.

Культивирование клеточных линий

В работе были использованы следующие клеточные линии меланомы человека: Mel Cher, Mel Kor, Mel Mtp, Mel Z, полученные в НИИ ЭДИТО ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», и линия из АТСС каталога Sk-mel-2 [3; 4; 19]. Клеточные линии культивировали на полной питательной среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка (ТЭС, NuClone, США); 2 мМ/мл глутамина, 50 мг/мл пенициллин-стрептомицина (ПанЭко, Россия) при 37 °С в атмосфере 5 %-ного CO₂.

Цитотоксичность

Клетки (8×10^4 клеток/мл) вносили в 96-луночный планшет в полной среде. Через 24 часа добавляли паклитаксел в диапазоне концентраций 0,2÷25 мкМ. Инкубацию проводили 48 ч, затем добавляли в каждую лунку по 20 мкл раствора МТТ (3-[4,5-диметилтриазол-2-ил]-2,5 дифенил тетразолия бромид) в конечной концентрации 0,5 мг/мл. Клетки инкубировали еще 4 часа, затем среду отбирали и добавляли к ним по 200 мкл ДМСО. Оптическую плотность раствора формазана определяли на спектрофотометрическом анализаторе «Униплан» (Россия) при 540 нм, используя ДМСО как нулевой контроль. Для препарата строили график зависимости «доза–эффект» и определяли IC₅₀.

Модуляция цитотоксичности

Инкубацию с веществами рапамицин (100 нМ) и хлорокин (30 мкМ) или ДМСО в соответствующей концентрации как отрицательным контролем проводили в течение 1 ч, затем добавляли Паклитаксел (10 мкМ) и инкубировали в течение 48 ч.

Проточная цитофлуориметрия

Клеточные линии сажали по 2×10^5 в дуплетах на 6-луночные планшеты в полной среде. Через 24 ч к клеткам добавляли рапамицин (100 нМ), хлорокин (20 мкМ) или контрольный раствор, инкубировали в течение 60 мин при 37 °С, затем вносили препарат паклитаксел (10 мМ) и оставляли клетки на 24 ч.

Для окрашивания клеток на ранний и поздний апоптоз использовали коммерческий набор Annexin-V FITC Apoptosis Kit (Invitrogen, США). К клеткам ($1 \times 10^6/100$ мкл) добавляли раствор, содержащий пропидий йодид и аннексин V. Клетки инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 15 мин, далее к клеткам добавляли 350–400 мкл связывающего буфера для остановки реакции. Анализ данных (10 000 событий) проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II.

ОТ-ПЦР

Детекцию экспрессии мРНК Beclin1 определяли с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Через 24 ч после культивирования с химиопрепаратами клетки лизировали, используя реагент TRIZol. Из лизата опухолевых клеток выделяли тотальную РНК в системе хлороформ-изопропиловый спирт. Обратную транскрипцию

проводили в соответствии со стандартным протоколом [12]. Реакцию проводили в амплификаторе «Герцик» (ДНК-Технология, Россия) по программе: 24 °С – 10 мин, 42 °С – 50 мин и 70 °С – 15 мин. Использовали следующие праймеры для гена *Beclin1* F:5'-AAGACAGAGCGATGGTAG-3' и R:5'-CTGGGCTGTGGTAAGTAA-3' (продукт 282 н.п.); для *beta-Actin* F:5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' и R:5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3' (продукт 460 н.п.). Условия амплификации: предварительная обработка – 94 °С – 2 мин; денатурация ДНК – 94 °С – 30 с; отжиг праймеров – 62 °С – 30 с; элонгация – 72 °С – 1 мин (для *Beclin1*, 26 циклов), а также 94 °С – 2 мин; 94 °С – 20 сек; 60 °С – 20 с; 72 °С – 45 с (для *beta-Actin*, 24 цикла).

Продукты амплификации анализировали после электрофореза в 1,5 %-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий в стандартной концентрации.

Уровень экспрессии *Beclin1* оценивали в относительных единицах оптической плотности (о.е.) с помощью программы «ImageJ» по отношению к уровню β -Actin.

Статистический анализ проводили с использованием программы GraphPad Prism v. 5.0. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента или критерию χ^2 . Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Цитотоксичность паклитаксела и его комбинаций с модуляторами аутофагии на клеточных линиях меланомы человека *in vitro*

Исследование было проведено на 5 клеточных линиях метастатической меланомы человека, 2 из которых (Mel Cher, Mel Z) имели мутантный статус *B-RAF*^{V600E}, а 3 (Mel Kor, Mel Mtp, Sk-mel-2) – “дикий” тип *B-RAF*^{WT}.

Цитотоксичность паклитаксела была изучена *in vitro* при инкубации клеток с препаратом в диапазоне концентраций 0,2 мкМ–2,5 мкМ в течение 48 часов с помощью МТТ–теста. Противоопухолевая активность препарата оценивалась по IC₅₀ по результатам трех независимых экспериментов (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика клеточных линий меланомы кожи человека и цитотоксичность паклитаксела

Клеточная линия	Статус <i>B-RAF</i>	Базальный уровень аутофагии	Степень индукции аутофагии	IC ₅₀ , мкМ
Mel Kor	WT	низкий	1,6	3,6 ± 1,1
Mel Mtp	WT	высокий	0,2	3,3 ± 0,6
Sk-mel-2	WT	низкий	5,7	5,79 ± 1,1
Mel Cher	V600E	высокий	0,9	14,7 ± 0,47
Mel Z	V600E	низкий	2,7	6,5 ± 2,6

Показано, что клеточные линии с диким типом гена оказались более чувствительными к действию препарата, чем с мутациями *B-RAF*^{V600E}. Среднее значение IC₅₀ для паклитаксела для *B-RAF*-мутированных линий составило 10,6 ± 5,8 мкМ, и для немутированных – 4,23 ± 1,36 мкМ ($p = 0,142$).

Анализ аутофагии проводили по оценке экспрессии мРНК гена *Beclin 1*, который участвует в инициации образования аутофагосом (табл. 1). Уровень базальной аутофагии клеток этих линий и ее индукция в условиях недостатка питательных веществ и факторов роста были описаны нами ранее [6]. В зависимости от базального уровня клеточные линии были разделены на линии с низким базальным уровнем аутофагии (Mel Z, Mel Kor, Sk-mel-2) и с высоким (Mel Mtp, Mel Cher). Способность клеточных линий к индукции аутофагии оценивалась по соотношению уровня мРНК *Beclin 1* в условиях 24-часового голодания к базальному уровню. При соотношении >1,1, клеточная линия оценивалась как способная к индукции аутофагии.

В качестве модуляторов аутофагии использовали рапамицин (индуктор) и хлорокин (ингибитор). Рапамицин является ингибитором mTOR-сигнального пути, который участвует в регуляции аутофагии при различных клеточных стрессах (например, голодании) [15]. Хлорокин блокирует аутофагию на этапе образования аутолизосомы [16].

Влияние модуляторов аутофагии на цитотоксичность паклитаксела (10 мкМ) оценивалась при преинкубации клеток с рапамицином (100 нМ) либо с хлорокином (30 мкМ) в течение 1 часа. Выживаемость клеток оценивали через 48 ч с помощью МТТ-теста (см. рисунок). Было показано, что клеточные линии mel Kor и Mel Z были чувствительны к ингибитору (выживаемость составила 12 и 8 % соответственно). Выживаемость других клеточных линий при инкубации с модуляторами аутофагии в течение 48 ч была выше 70 % относительно контроля.

Анализ результатов показал, что хлорокин потенцирует цитотоксичность паклитаксела на клеточных линиях метастатической меланомы человека с мутациями в гене *B-RAF*. Так, выживаемость клеток линии Mel Cher при инкубации с паклитакселом (10 мкМ) составила 56 ± 11 %, в комбинации с хлорокином – только 6 ± 2 %. При этом индуктор аутофагии статистически значимо не влиял на выживаемость меланомных клеток. Незначительное увеличение цитотоксичности паклитаксела при комбинации с рапамицином или хлорокином на клетках меланомы кожи человека с *B-RAF*^{WT} статусом может быть объяснено цитотоксичностью самих модуляторов.

Таким образом, хотя клеточные линии с *B-RAF*^{V600E} были резистентны к паклитакселу, их комбинация с хлорокином синергично увеличивала цитотоксичность препарата.

Индукция апоптотической гибели клеток меланомы человека под действием паклитаксела и его комбинаций с модуляторами аутофагии *in vitro*

Было изучено влияние паклитаксела и его комбинаций с модуляторами на индукцию апоптоза на клеточных линиях меланомы человека после 24-часовой инкубации с препаратами (табл. 2). Для этого клетки окрашивали набором Annexin-V FITC Apoptosis Kit и анализировали методом проточной цитофлуориметрии.

Несмотря на то, что цитотоксичность паклитаксела была выше для клеток с диким типом *B-RAF*, цитостатик активировал апоптоз в среднем у 19,8 ± 1,3 % клеток *B-RAF*^{WT}, и 27,5 ± 0,3 % клеток *B-RAF*^{V600E} ($p = 0,015$).

Таблица 2

Апоптотическая активность паклитаксела и его комбинация с модуляторами аутофагии на клеточных линиях меланомы

Клеточная линия	Статус <i>B-RAF</i>	Уровень апоптоза при 24-часовой инкубации с химиопрепаратами, $m \pm SD(\%)$				
		Паклитаксел	Паклитаксел + хлорокин	Хлорокин	Паклитаксел + рапамицин	Рапамицин
<i>Mel Mtp</i>	wt	20,7 ± 3,4	18,3 ± 1,3	7,3 ± 1,3	18,4 ± 2,3	11,7 ± 4,5
<i>Sk-mel-2</i>		18,8 ± 3,4	24,8 ± 6,5	6,4 ± 0,3	14,3 ± 3,7	1,8 ± 0,7
<i>Mel Cher</i>	mt	27,3 ± 2,2	43,0 ± 1,9	2,3 ± 0,3	18,3 ± 0,7	3,5 ± 1,6
<i>Mel Z</i>		27,7 ± 2,6	52,5 ± 1,8	4,35 ± 2,8	30,2 ± 7,8	2,6 ± 1,5

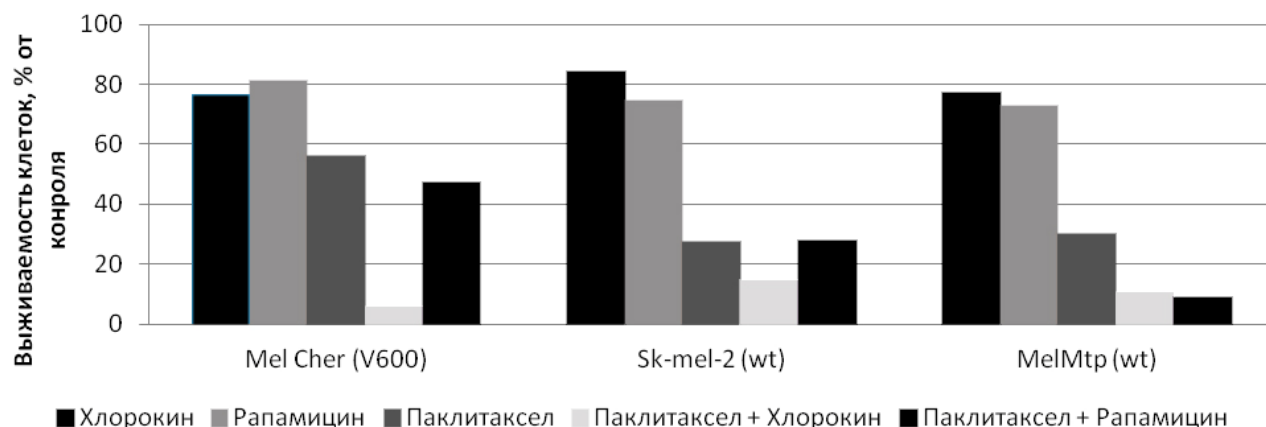


Рис. Влияние модуляторов аутофагии на цитотоксичность паклитаксела.

Анализ индукции апоптоза под действием комбинаций паклитаксела с модуляторами аутофагии показал, что увеличение индукции апоптоза происходит только в клетках с мутацией в гене *B-RAF* при ингибировании запуска аутофагии ($p=0,05$). В остальных случаях значимой индукции апоптоза не наблюдалось.

Таким образом, синергизм паклитаксела и хлорокина может быть связан с повышением апоптотической активности в клетках *B-RAF^{V600E}*.

Выводы

Проведенное нами исследование показало, что мутации в гене *B-RAF* ассоциированы с изменением уровня аутофагии в клетках метастатической меланомы. Клеточные линии ММ с *B-RAF^{V600E}* оказались более резистентны к паклитакселу в сравнении с клеточными линиями, не несущими мутаций. При исследовании апоптотической активности паклитаксела и его комбинаций с модуляторами аутофагии увеличение апоптоза наблюдалось только у клеточных линий с мутантным типом гена. При этом синергизм цитотоксической активности отмечали только при комбинации паклитаксела с хлорокином. Хотя *B-RAF^{WT}* клетки ММ были более чувствительны к паклитакселу, добавление ингибитора не влияло на гибель клеток.

В настоящее время существует два противоположных подхода к использованию модуляторов аутофагии в онкологии.

Литература

1. *Имянитов Е.Н.* Эпидемиология и биология опухолей кожи // Практическая онкология. – 2012. – Т. 13, № 2 – С. 61–8.
2. *Ковалева О.В., Шитова М.С., Зборовская И.Б.* Аутофагия: клеточная гибель или способ выживания? // Онкогематология. – 2014. – Т. 7, № 2. – С. 103–13.

Одни авторы считают, что необходимо ингибировать процесс для блокирования цитопротекторной функции аутофагии. Другие говорят о ее активации, чтобы запустить клеточную гибель путем аутофагии опухолевых клеток, высоко резистентных к запуску апоптоза. Чаще всего выбор тактики зависит от этиологии злокачественного новообразования.

Нами было показано, что ингибирование аутофагии хлорокином при применении паклитаксела – цитостатического агента, увеличивает гибель опухолевых клеток в случае *B-RAF*-мутированных опухолей, но не влияет на клетки “дикиго” типа.

Таким образом, мутации в гене *B-RAF* могут определять чувствительность клеточных линий меланом к запуску в них аутофагии и резистентность меланомы к паклитакселу. Комбинация препарата с ингибиторами аутофагии может усилить его противоопухолевую активность за счет активации апоптоза. Ингибирование аутофагии может рассматриваться как перспективный подход к комбинированной терапии ММ кожи как у пациентов с мутированным статусом гена *B-RAF*, так и с геном “дикиго” типа. Эффективные комбинации требуют дополнительного изучения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 12-04-33257 мол_а_вед.

3. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин // Вестник РАМН. – 2005. – № 7. – С. 37–40.
4. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Бурова О.С. и др. Сравнение уровня HSP70 на клеточных линиях меланомы // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, №1. – С. 43–8.
5. Официальные периодические издания: электронный путеводитель/ Всемирная организация здравоохранения: опухоли кожи URL: www.who.int (дата обращения: 18.08.2014)
6. Рябая О.О., Цыганова И.В., Сидорова Т.А. и др. Влияние активирующих мутаций V600 гена *B-RAF* на способность клеток меланомы к аутофагии // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2013. – № 3. – С. 68–72.
7. Харкевич Г.Ю., Демидов Л.В. Современный взгляд на лекарственное лечение диссеминированной меланомы кожи. (Практ. рекомендации общества онкологов-химиотерапевтов по диагностике, лечению и наблюдению больных меланомой кожи) // Практическая онкология. – 2012. – Т. 13 – № 2. – С. 143–9.
8. Armstrong J.L., Corazzari M., Martin S et al. Oncogenic B-RAF signaling in melanoma impairs the therapeutic advantage of autophagy inhibition // Clin Cancer Res. – 2011. – 17(8). – P. 2216–26.
9. Cagnol S., Chambard J.C. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death—apoptosis, autophagy and senescence // FEBS J. – 2010. – 277. – P. 2–21.
10. Corcelle E., Nebout M., Bekri S. et al. Disruption of autophagy at the maturation step by the carcinogen lindane is associated with the sustained mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity // Cancer Res. – 2006. – 66. – P. 6861–70.
11. Davies H., Bignell G.R., Cox C. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer // Nature. – 2002. – 417. – С. 949–54.
12. Deng R., Li W., Guan Z. et al. Acetylcholinesterase expression mediated by c-Jun-NH2-terminal kinase pathway during anticancer drug-induced apoptosis // Oncogene. – 2006. – 25. – P. 7070–7.
13. Dhomen N., Marais R. BRAF signaling and targeted therapies in melanoma // Hematol Oncol Clin North Am. – 2009. – 23. – P. 529–45.
14. Ferlay J., Shin H.R., Bray F. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 // Int J Cancer. – 2010. – 127(12). – P. 2893–917.
15. Jung C.H., Ro S.H., Cao J. et al. mTOR regulation of autophagy // FEBS Lett. – 2010. – 584. – P. 1287–95.
16. Kimura T., Takabatake Y., Takahashi A., Isaka Y. Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy // Cancer Res. – 2013. – 73(1). – P. 3–7.
17. Legha S.S., Ring S., Papadopoulos M. et al. A phase II trial of taxol in metastatic melanoma // Cancer. – 1990. – 65. – P. 2478–81.
18. Levine B., Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? // J Clin Invest. – 2005. – 115(10). – P. 2679–88.
19. Michailova I.N., Morozova L.Ph., Golubeva V.A. et al. Cancer/testis genes expression in human melanoma cell lines // Melanoma Research. – 2008. – 5. – P. 303–13.
20. Veldhoen R.A., Banman S.L., Hemmerling D.R. et al. The chemotherapeutic agent paclitaxel inhibits autophagy through two distinct mechanisms that regulate apoptosis // Oncogene. – 2013. – 32(6). – P. 736–46.
21. Yang Z., Klionsky D.J. Eaten alive: a history of macroautophagy // Nat Cell Biol. – 2010. – 12. – P. 814–22.

СПИСКО ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ММ – метастатическая меланома (metastatic melanoma)

СОДЕРЖАНИЕ ЖУРНАЛОВ за 2014 год

№1 2014

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

Н.К. Клаан, Т.А. Пронина, Л.П. Акинъшина, В.В. Решетникова
**ЯДЕРНЫЙ ФАКТОР КАППА В (NF-KB) В КАЧЕСТВЕ МИШЕНИ
ДЛЯ ДЕЙСТВИЯ ПРИРОДНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ**.....3

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*В.А. Мисюрин, А.Е. Лукина, А.В. Мисюрин, Л.А. Кесаева, Е.Н. Мисюрина, Ю.П. Финашутина,
И.Н. Солдатова, А.А. Крутов, И.В. Санникова, М.Н. Ротанова, В.А. Лапин, О.А. Рукавицын,
С.В. Шаманский, Н.К. Хуажева, В.Л. Иванова, Н.В. Архипова, Ю.А. Лесная, О.В. Шитова,
Е.А. Борисенкова, Т.М. Толстокожая, Е.Н. Голубева, Н.А. Бычкова, Н.А. Вовилина, И.И. Гуцанская,
Г.Н. Михайлова, А.Ю. Барышников*
**ОСОБЕННОСТИ СООТНОШЕНИЯ УРОВНЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ PRAME И PML/RAR α
В ДЕБЮТЕ ОСТРОГО ПРОМИЕЛОЦИТАРНОГО ЛЕЙКОЗА**.....9

Е.Н. Захарова, П.К. Иванов, Т.Н. Заботина, Н.В. Голубцова, И.В. Чинарева, А.С. Гриневич, Д.Ю. Блохин
**ДВУХЦВЕТНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МКА СЕРИИ ISO, КОНЪЮГИРОВАННЫХ
С ЦИАНИНОВЫМ КРАСИТЕЛЕМ IMD-306**.....17

*И.Ю. Филюшкина, Н.В. Голубцова, В.В.Новиков, М.А. Барышникова, З.А. Соколова,
А.И. Чкалина, Е.В. Борисова, П.К. Иванов, И.К. Воротников, А.Ю. Барышников*
**ИЗМЕНЕНИЕ СЫВОРОТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ
РАСТВОРИМЫХ ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ АНТИГЕНОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**.....23

А.Н. Хочанский, А.Е. Земляков, О.В. Калужин, В.В. Решетникова
**ВЛИЯНИЕ β -ГЛИКОЗИДОВ МУРАМИЛДИПЕПТИДА
НА НК-АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ
И ФАГОЦИТАРНУЮ ФУНКЦИЮ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА**.....27

М.В. Дмитриева, Н.А. Оборотова, О.Л. Орлова, А.П. Полозкова, И.И. Агапов, М.П. Кирпичников
ЛИПОСОМАЛЬНАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА БОРХЛОРИНА.....31

Н.В. Гриценко, М.А. Барышникова, А.П. Полозкова, Н.А. Оборотова, А.Ю. Барышников
**ЛИПОСОМАЛЬНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ
НЕ ИСПОЛЬЗУЮТ CD95-ЗАВИСИМЫЙ СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ АПОПТОЗА**.....37

*Г.К. Герасимова, Н.П. Яворская, И.С. Голубева, Г.Н. Апрышко,
Ю.Ю. Солодунов, Б.В. Страдомский, А. Ю. Барышников*
**ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА СТЕЛЛАНИН®
НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЯХ МЫШЕЙ**.....43

*Н.В. Гриценко, Б. Альбассит, М.А. Барышникова, Л.В. Ланцова,
А.П. Полозкова, Н.А. Оборотова, В.П. Краснов, А.Ю. Барышников*
**СРАВНЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ
ИЗ КЛАССА НИТРОЗОМОЧЕВИНЫ**.....49

В.А. Горбунова, Л.В. Манзюк, Л.В. Демидов, Г.Ю. Харкевич
**ЛИЗОМУСТИН – ОТЕЧЕСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ
ИЗ ГРУППЫ ПРОИЗВОДНЫХ НИТРОЗОМОЧЕВИНЫ В ЛЕЧЕНИИ МЕЛАНОМЫ КОЖИ**.....55

Правила оформления статей для публикации.....22; 42; 54

Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием
«Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике» Москва, 20-21 марта 2014 года
ТЕЗИСЫ.....57

УДК 616-006-097:611.018.83:576.385.5

Т.В. Ахлынина^{1;2}, А.В. Мисюрин¹⁻³, Н.А. Лыжко^{1;2}, Ю.П. Финашутина^{1;2}, В.А. Мисюрин¹, Е.В. Аксенова²,
И.Н. Солдатова^{1;2}, А.П. Шпакова³, Б.Б. Хасигова³, Т.И. Булычева³, О.С. Бурова¹

НАЛИЧИЕ ИММУНОГЕННОГО АНТИГЕНА В ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТКЕ СПОСОБСТВУЕТ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОМУ ДЕЙСТВИЮ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

¹ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

²ООО «ГеноТехнология», Москва

³ФГБУ Гематологический Научный Центр МЗ РФ, Москва

Контактная информация

Мисюрин Всеволод Андреевич, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной химиотерапии НИИ ЭДнТО

адрес: 115478, Москва, Каширское ш., 24; тел. +7(985)436-30-19

e-mail: vsevolod.misyurin@gmail.com

Статья поступила 08.10.2014, принята к печати 24.11.2014.

Резюме

Недавно был обнаружен цитотоксический ответ ДК, направленный против ОК. В качестве условий для проявления этого эффекта указывали на необходимость мембранного контакта между ДК и ОК и предварительную неспецифическую стимуляцию ДК. Однако эти условия оказались недостаточными. Мы установили, что уровень антипролиферативного действия ДК напрямую связан с наличием опухолевого антигена в ОК. Нам удалось показать, что ещё одним необходимым условием является как нагрузка ДК специфическим опухолевым антигеном, так и наличие данного антигена в опухолевой клетке. Мы показали преимущества использования очищенного антигена для нагрузки ДК над стратегией использования лизата ОК в качестве смеси антигенов.

Ключевые слова: дендритные клетки, антипролиферативное действие, PRAME, опухолевые клетки.

T.V. Ahlynina^{1;2}, A.V. Misyurin¹⁻³, N.A. Lyzhko^{1;2}, Yu.P. Finashutina^{1;2}, V.A. Misyurin¹, E.V. Aksenova²,
I.N. Soldatova^{1;2}, A.P. Shpakova³, B.B. Hasigova³, T.I. Bulycheva³, O.S. Burova¹

PRESENCE OF IMMUNOGENIC ANTIGEN IN TUMOR CELLS PROMOTES ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF DENDRITIC CELLS

¹FSBSI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Institute», Moscow

²«GeneTechniology», Moscow

³FSBI «Hematology Research Center», Moscow

Abstract

A special cytotoxic response of DC against TC has been discovered recently. There are two conditions critically need for the manifestation of this effect. First, it is a membrane contact between DC and the OC. Second, nonspecific pre-stimulation of DC is required. However, these conditions have not been sufficient. We have shown that additional necessary condition is the loading of DC with specific tumor antigen. Furthermore, the antigen should be exist in a tumor cell. We have shown the advantages of using purified antigen for activation of DC. Activated DC have inhibited the growth of antigen-positive TC successfully. We suppose that is better to use a pure antigen than a mixture of antigen for this effect. We found that the level of anti-proliferative effect directly depends on the presence of tumor antigen in OK.

Key words: dendritic cells, cytotoxic action, PRAME, tumor cells.

Введение

В последние годы активно разрабатываются новые методы терапии опухолевых заболеваний, в частности, методы иммунотерапии [2–7]. Основанием для развития этих методов является то, что некоторые опухоли являются иммуногенными. Известно, например, что клетки меланомы экспрессируют на поверхности иммуногенные маркеры [35]. Эти маркеры способствуют развитию собственного иммунного ответа и регрессии опухоли. Частичная регрессия первичного очага наблюдается примерно в трети случаев, а в 1 – 2% случаев может произойти полная регрессия [17].

ДК как АПК постоянно захватывают, перерабатывают и представляют антигены Т- и В-лимфоцитам. Распознав антиген, Т- и В-клетки активируются и осуществляют антиген-специфический ответ.

В то же время, в ряде работ было показано, что ДК, помимо презентации опухолевых антиге-

нов, способны сами оказывать антипролиферативное действие на опухолевые клетки [30; 36; 40]. ДК захватывают антигены из живых, апоптозных или некротических клеток [36]. После взаимодействия ДК с живыми опухолевыми клетками, опухолевые клетки погибают, а их антигены захватываются ДК и представляются Т-лимфоцитам [28; 38], так же, как и после захвата антигенов из апоптозных и некротических клеток. В ряде работ было показано, что липополисахарид (ЛПС), который вызывает созревание ДК, стимулировал ДК и приводил к усилению подавления роста опухолевых клеток [32; 34]. Но в то же время было показано, что в зависимости от дозы ЛПС действие ДК на опухоли может быть различным, как подавляющим, так и стимулирующим рост опухоли [37].

Таким образом, очевидно, что ДК могут контролировать рост опухолей *in vivo*. Было показано, что только при прямом контакте ДК с опухолевыми клетками осуществляется подавление роста последних [30; 32; 33].

Показано, что ЛПС не действует специфически, а только усиливает имеющуюся способность ДК секретировать факторы, угнетающие рост опухолевых клеток [30]. Таким образом, существует неизвестный фактор, который определяет возможность специфического взаимодействия между ДК и клетками опухоли, выраженного в антипролиферативном воздействии ДК против клеток-мишеней.

Мы предположили, что ДК осуществляют свою способность угнетать рост опухоли только в том случае, если они захватывают такой же антиген, которым обладает и опухолевая клетка. Согласно этому предположению, можно целенаправленно нагрузить ДК специфическим опухолевым антигеном для подавления роста опухоли, позитивной по данному антигену.

Очень важным является выбор опухолевого антигена для нагрузки ДК в условиях *ex vivo* [4–7; 21–26]. С этой целью используют лизаты опухолевых клеток, положительных по определённому маркеру [2; 9; 15; 27–29] или очищенные рекомбинантные антигены.

Но нужно учесть, что такой лизат содержит не только полезные антигенные детерминанты, но и значительное число примесей, которые в лучшем случае окажутся неэффективными в процессе нагрузки антигеном.

Необходимо уточнить, что профиль экспрессии антигенов всегда отличается в разных клеточных линиях. Иммуногенные белки, кодируемые опухоль-ассоциированными генами *GAGE*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *PASD1*, *SEMG1*, *SPANXA1* и *PRAME*, и могут стать теми антигенами, которыми будет опосредован дендритноклеточный антипролиферативный ответ [10]. Однако если эти антигены не будут экспрессироваться клетками-мишенями, цитотоксический эффект нагруженных ДК против клеток опухоли может и не проявиться. Мы считаем, что для наиболее активного воздействия нужно использовать единственный антигенный белок, очищенный от примесей. Нами был выбран белок *PRAME*, который гиперэкспрессируется в клетках меланомы [1; 14; 16; 39]. Белок *PRAME* кодируется одноимённым РТГ и отличается высокой иммуногенностью. Его экспрессия распространена при многих онкологических заболеваниях [1; 8; 9–13].

Целью данной работы явилось сравнение антипролиферативного действия ДК, нагруженных и не нагруженных рекомбинантным белком *PRAME*, на рост культивируемых *PRAME*⁺ опухолевых и нормальных клеток.

Материалы и методы

Культуры клеток

В работе использовали линии клеток: K562, происшедшие из эритробластного лейкоза, монобластные U937, моноцитарные THP-1, промоноцитарные NMO-1 и нормальные фибробласты WI-38. Культуры клеток росли в среде RPMI-1640, содержащей 2 мМ глутамина, 10 мМ HEPES, 10 % ТЭС (“MP Biomedical”, США), 40 мкг/мл гентамицинсульфата (“RKA”, Словения).

Для оценки возможного антипролиферативного действия белка *PRAME* на клетки K562, белок *PRAME* в буферном растворе, содержащем 50 мМ трис, 0,1 %-ный N-лауроилсаркозин, инкубировали с клетками K562. Белок *PRAME* в концентрациях 8 мкг/мл не оказывал антипролиферативного эффекта на клетки.

Выделение РНК и ПЦР в реальном времени

Выделение РНК проводилось гуанидин тиоционат хлороформ-фенольным методом из периферической крови, костного мозга и клеточных линий [31]. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора случайных нуклеотидных гексамеров в качестве праймеров и обратной транскриптазы M-MLV (“Promega”, США).

Количественное определение экспрессии генов *GAGE*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *PASD1*, *SEMG1*, *SPANXA1* и *PRAME* проводилось методом ПЦР в реальном времени по технологии TaqMan с использованием приборов IQ Cycler (“BioRad”, США) и Applied Biosystems 7500. Системы специфических праймеров и зондов разработаны на основе данных по нуклеотидным последовательностям, предоставленных ресурсом <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Флуоресцентный сигнал определяли при 60 °С с использованием фильтров для FAM. В качестве контрольного гена использовали *ABL*. В качестве положительных контролей (стандартов) использовали разведения плазмид с известным числом копий, с вставкой участка соответствующего гена. Количество копий гена в образцах определялось по калибровочной кривой, построенной по 10-кратным разведениям стандартов. Экспрессия гена вычислялась как относительная:

$$\text{число копий изучаемого гена} / \text{число копий контрольного гена} \times 100\%.$$

Получение дендритных клеток

Методика получения ДК была нами взята из работы Чкадуа и соавт. [27] с некоторыми модификациями. Для получения ДК кровь донора или КМ больного ОММЛ брали в пробирки с гепарином (30 ед/мл), наслаивали на Lympho separation medium (1,077, “MP Biomedicals”) для получения фракции мононуклеаров, центрифугировали при 1500 об/мин 40 мин.

Полученные мононуклеары суспендировали в концентрации 10⁷/мл в среде RPMI-1640 с 2 мМ глутамина, 10 мМ HEPES, 40 мкг/мл гентамицина, с 10 % сыворотки крови донора или 10 % ТЭС и помещали в лунки 24-луночной платы по 1 мл в лунку. Через 2 часа культивирования при 37 °С с 5 % CO₂ из лунок отбирали неприкрепившиеся лимфоциты и 2 раза промывали лунки той же средой для полного удаления лимфоцитов, которые собирали в отдельный флакон. К части лимфоцитов добавляли интерлейкин-2 (ИЛ-2; 10 ед/мл; “Sigma”, США) до совместной инкубации с ДК.

Для получения зрелых ДК к прикрепившимся клеткам добавляли полную среду для культивирования, содержащую цитокины: по 80 нг/мл ГМ-КСФ; “Sigma”) и 10 нг/мл интерлейкина-4 (ИЛ-4; “Sigma”). На 2; 4 и 6 сутки культивирования к клеткам добавляли по 0,1 мл смеси ГМ-КСФ (800 нг/мл) и ИЛ-4 (100 нг/мл). Для получения незрелых ДК выделенные клетки инкубировали без добавления цитокинов.

Зрелость дендритных клеток определяли в реакции иммунофлуоресценции методом двойного окрашивания. Собранные клетки из культуральных флаконов трижды отмывали, суспендировали в PBS pH=7,5, и центрифугировали для получения осадка, затем ресуспендировали и отмывали клетки в PBS до конечной плотности 1×10⁵ (для каждого образца). В пробирки, содержащие клетки, добавляли по 10 мкл моноклональных антител, конъюгированных с FITC, и 10 мкл антител конъюгированных с PE, инкубировали 30 минут при 4 °С; после чего

клетки дважды отмывали в 1 мл PBS (центрифугированием) и ресуспендировали в 300 мкл PBS, содержащем 1 %-ный формалин. В качестве контроля использовали IgG2b, конъюгированных с FITC, и МКА CD20 PE. Экспрессию антигенов на клеточной поверхности оценивали на проточном цитофлуориметре BD FACSCantoTMII (США). Анализируемый гейт устанавливали на основании комбинации светорассеивания и размера клеток. В работе использовались антитела фирмы "Beckman Coulter" (Франция).

«Нагрузка» ДК

ДК нагружали либо лизатом [29] клеток K562, либо белком PRAME (8 мкг/мл). Для получения лизата клетки помещали в PBS, 4 раза быстро замораживали в жидком азоте и оттаивали, затем центрифугировали при 12000 об/мин и супернатант использовали для нагрузки. Соотношение ДК к клеткам K562 – 1 : 3. ДК инкубировали с антигеном 1 сутки.

Терминальная дифференцировка ДК

Клетки после «нагрузки» отмывали от среды и помещали в среду с фактором некроза опухоли- α (20 нг/мл, ФНО- α , "Sigma") и простагландином E₂ (250 нг/мл, ПГЕ₂, "Sigma") на 2 дня.

Совместная инкубация ДК с опухолевыми или нормальными клетками. После окончания инкубации со всеми цитокинами, ДК собирали, центрифугировали, ресуспендировали в исходной среде роста, помещали в 96-луночную плату отдельно или в смеси с клетками линий K562, U937, NOMO-1, THP-1 или с нормальными фибробластами линии WI-38. Клетки в лунках перемешивали и оставляли инкубироваться на несколько суток. За сутки до окончания инкубации в лунки добавляли по 1 мкКи (40 кБк) [³H]-тимидина, затем определяли включение [³H]-тимидина [30]. В лунках без [³H]-тимидина подсчитывали число клеток, окрашенных трипановым синим.

Результаты

Клеточные линии различались по скорости роста: медленно растущие культуры NOMO-1 и THP-1 (уровень экспрессии гена PRAME в этих клетках составил 0,713 и 44,3 % соответственно) и быстрорастущие K562 и U937 (в этих клетках уровень экспрессии PRAME составил 541 и 3,4 % соответственно). Наблюдались различия и в самом профиле экспрессии РТГ. Кроме PRAME, в клетках линий K562 наблюдалась экспрессия генов GAGE, NY-ESO-1, MAGEA1, PASD1, SEMG1 и SPANXA1. Мы не обнаружили мРНК GAGE, NY-ESO-1, MAGEA1, PASD1, SEMG1 и SPANXA1 в линиях NOMO-1 THP-1 и U937, что означает и отсутствие в клетках белков, кодируемых данными генами.

В ДК, выделенных из мононуклеарной фракции крови донора, после инкубации с факторами, вызывающими их полное созревание, присутствовало 39,4 % CD83⁺ ДК и 55,9 % CD86⁺ ДК.

Зрелые ДК донора, нагруженные и ненагруженные белком PRAME, подавляли включение [³H]-тимидина в медленно растущие клетки NOMO-1 и THP-1 при их соотношении 1 : 1 (по 5×10³ в лунке каждого вида клеток) по сравнению с интактными клетками и клетками, растущими с незрелыми ДК (рис. 1). Зрелые ДК также подавляли рост нормальных фибробластов WI-38, видимо, определяя их как чужеродные клетки.

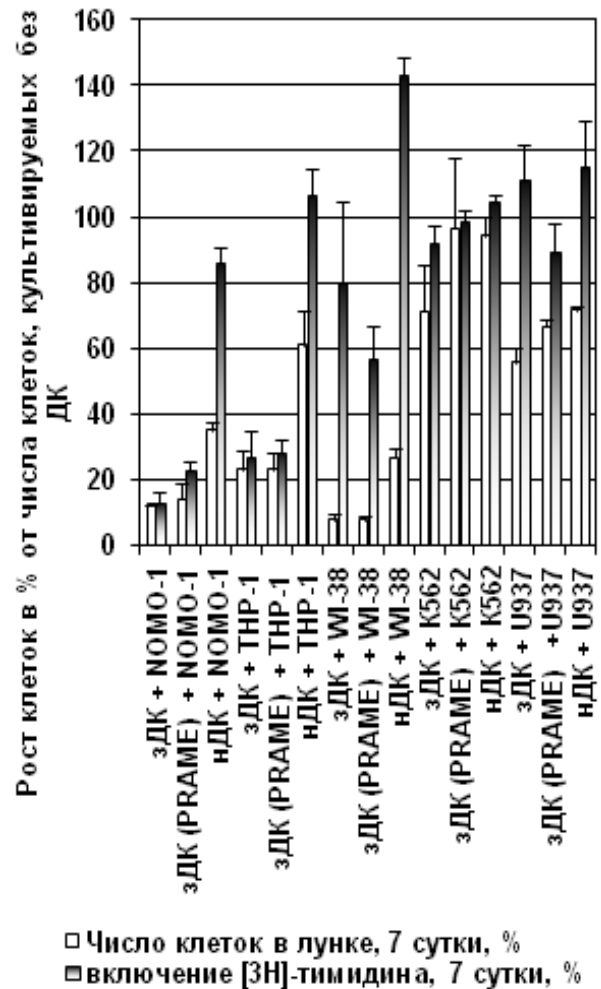


Рис. 1. Влияние дендритных клеток донора на рост клеток к 7 суткам инкубации, соотношение клеток при посеве 1:1 (по 5×10³ клеток в лунке каждого вида клеток):

Зрелые ДК не оказывали токсического воздействия на аутологичные фибробласты (данные не представлены).

Предполагалось, что ДК, нагруженные белком PRAME, будут значительно подавлять рост быстрорастущих клеток K562, имеющих высокий уровень экспрессии гена PRAME.

Однако ДК, нагруженные белком PRAME, при совместной инкубации с быстрорастущими лейкозными клетками K562 или U937 практически не проявили ожидаемого эффекта. В присутствии незрелых ДК отмечено увеличение скорости роста клеток (рис. 1).

Одновременное увеличение в два раза плотности зрелых ДК и клеток-мишеней при их совместной инкубации усиливало антипролиферативный эффект ДК на все клетки (рис. 2).

Мы определяли процент клеток перевиваемых линий, культивируемых совместно с ДК, и сравнивали с количеством интактных клеток. Зрелые ненагруженные ДК, выделенные из крови донора, при культивировании в соотношении ДК : клетки-мишени 1 : 1 (по 10⁴ в лунке каждого вида клеток) полностью подавили рост клеток NOMO-1, а рост остальных клеток был подавлен на 40–60 %. Нагрузка ДК лизатом клеток K562 вызвала усиление действия ДК против клеток K562.

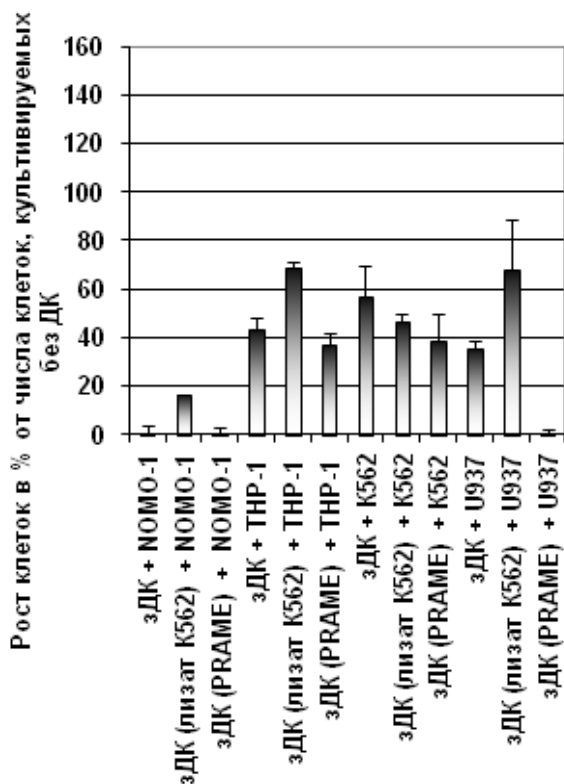


Рис. 2. Влияние дендритных клеток донора на линии клеток на 5 сутки инкубации при соотношении $10^4:10^4$.

При этом рост клеток других линий подавлялся слабее, чем при культивировании со зрелыми ненагруженными ДК. ДК, нагруженные белком PRAME, подавили рост клеток ТНР-1 и К562 на 60%, максимальное подавление наблюдали на клетках НОМО-1 и U937 (рис. 2).

Таким образом, при увеличении плотности клеток нагрузка ДК специфическим опухолевым антигеном – белком PRAME, приводила к более сильному подавлению роста всех клеток по сравнению с ДК, не нагруженными PRAME, или нагруженных лизатом клеток линии К562. ДК, нагруженные лизатом клеток К562, подавляли рост клеток К562, но слабее по сравнению с ДК, нагруженными рекомбинантным PRAME. Нагрузка ДК лизатом клеток К562 вызывала также более слабое подавление роста других линий клеток по сравнению с ДК без нагрузки и нагруженных белком PRAME. На микрофотографиях клеток, сделанных в конце инкубации (рис. 3), видно, что там, где воздействие ДК оценивалось как сильное, меняется плотность клеточных культур, заметно изменяется вид клеток.

При увеличении соотношения ДК:К562=5 : 1 ($2,5 \times 10^4$: 5×10^3) антипролиферативное действие ДК было значительным. Незрелые ДК, нагруженные белком PRAME, слабее подавляли рост клеток по сравнению с ненагруженными ДК (рис. 4, а). Напротив, зрелые ДК, нагруженные белком PRAME, и затем инкубированные с ФНО-альфа и ПГЕ₂, оказывали более сильное антипролиферативное действие (рис. 4, б). Если после нагрузки белком PRAME ДК не подвергались терминальной дифференцировке, то их действие на клетки К562 было слабым. Вероятно, после того, как ДК вступают в контакт с опухолевыми клетками, перерабатывая опухолевые антигены, опухолевые клетки, остав-

шиеся живыми, подавляют их дальнейшее созревание и тем самым ослабляют способность выполнять функции АПК активировать Т-лимфоциты и оказывать полноценный антипролиферативный эффект.

Ещё большее антипролиферативное действие ДК на клетки опухолей проявлялось после добавления лимфоцитов донора к смеси клеток ДК+К562. При этом действие лимфоцитов, предварительно активированных ИЛ-2, в данном случае не отличалось от неактивированных лимфоцитов (рис. 4).

Клетки костного мозга больного ОММЛ получили через 2 мес после установления диагноза и проведения 3 курсов химиотерапии. Уровень экспрессии гена PRAME в дебюте заболевания составлял 3,3 %, а в день взятия КМ для выделения ДК экспрессия гена PRAME была существенно ниже – около $4,32 \times 10^{-3}$ %. Созревание ДК индуцировали согласно протоколу получения ДК из мононуклеаров периферической крови здорового донора. Сравнивали влияние плотности и соотношения ДК к клеткам К562 на рост клеток К562 (рис. 5). Для оценки антипролиферативного эффекта подсчитывали число клеток К562 в лунке.

При совместной инкубации в соотношении 1 : 1 число клеток К562 уменьшалось в 2,5 раза по сравнению с контролем. Увеличение концентрации зрелых ДК до соотношения 3 : 1 в лунке относительно исходной концентрации клеток К562 (5×10^3 в лунке) приводило к снижению числа клеток К562 к 7 суткам инкубации почти в 7 раз. При повышении исходной концентрации ДК и клеток К562 до 10^4 или $1,5 \times 10^4$ в лунке влияние ДК было слабее. Нагрузка ДК белком PRAME не дала никакого преимущества по сравнению со зрелыми ДК, ненагруженных антигеном (рис. 5).

Обсуждение

Как видно из результатов первого эксперимента (рис. 1), антипролиферативное действие ненагруженных ДК зависит от степени их зрелости. Зрелые ДК по сравнению с незрелыми сильнее подавляли рост опухолевых клеток.

Кроме того, антипролиферативное действие ДК на опухолевые клетки зависело от скорости роста клеток.

Согласно результатам, быстрорастущие опухолевые клетки оказались намного более устойчивы к антипролиферативному воздействию ДК. Зрелые ДК также вызывают гибель нормальных фибробластов линии WI-38, возможно, признавая их чужеродными.

Согласно нашим наблюдениям, для подавления роста опухоли было необходимо, чтобы число ДК значительно превышало количество опухолевых клеток. Вероятно, при активно пролиферирующей опухоли немногочисленные ДК просто не успевают войти в контакт со всеми клетками. Особенно если учесть, что ДК не делятся в культуре, то по истечении некоторого времени опухолевые клетки становились столь многочисленными, что на их фоне не ощущалось антипролиферативного действия редких ДК.

В нашем случае число клеток К562, увеличивается с 5×10^3 в 9 и 30 раз за 3 и 7 суток соответственно (рис. 5). Этот результат согласуется с наблюдениями другой группы учёных. Согласно Pan et al., для значительного антипролиферативного эффекта соотношение числа ДК к клеткам разных опухолей должно быть 10 и выше [36].

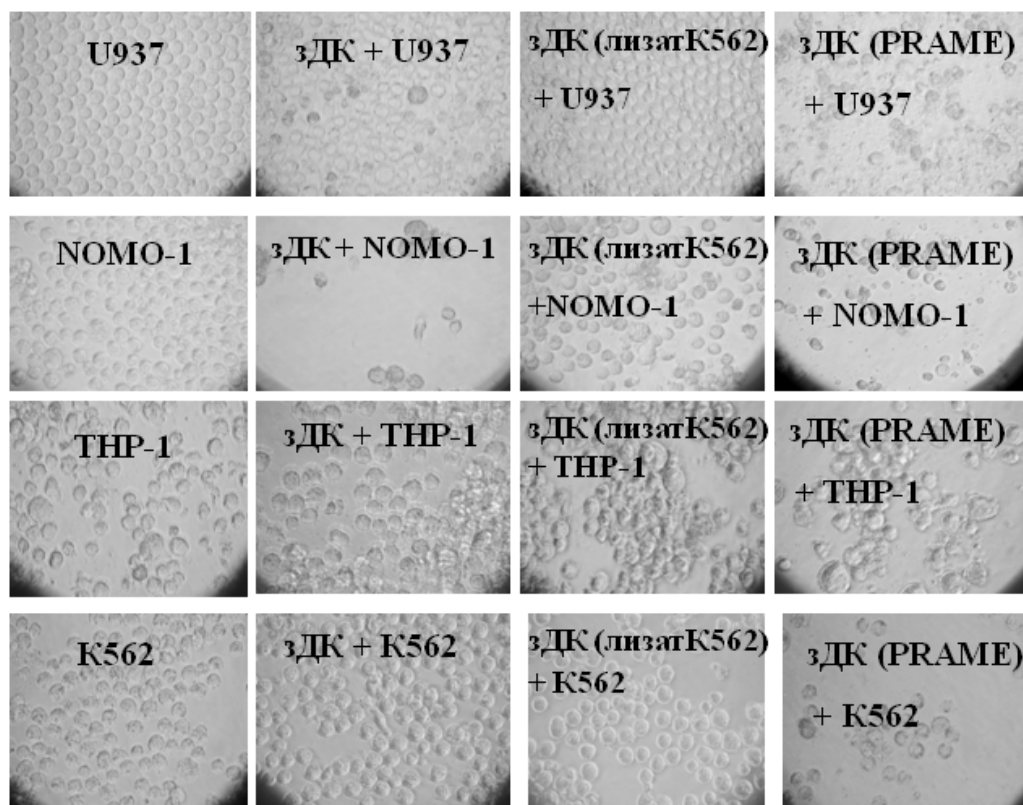


Рис. 3. Микрофотография клеток на 5 сутки инкубации, соотношение при посеве $10^4:10^4$. Обозначения, как на рис. 2.

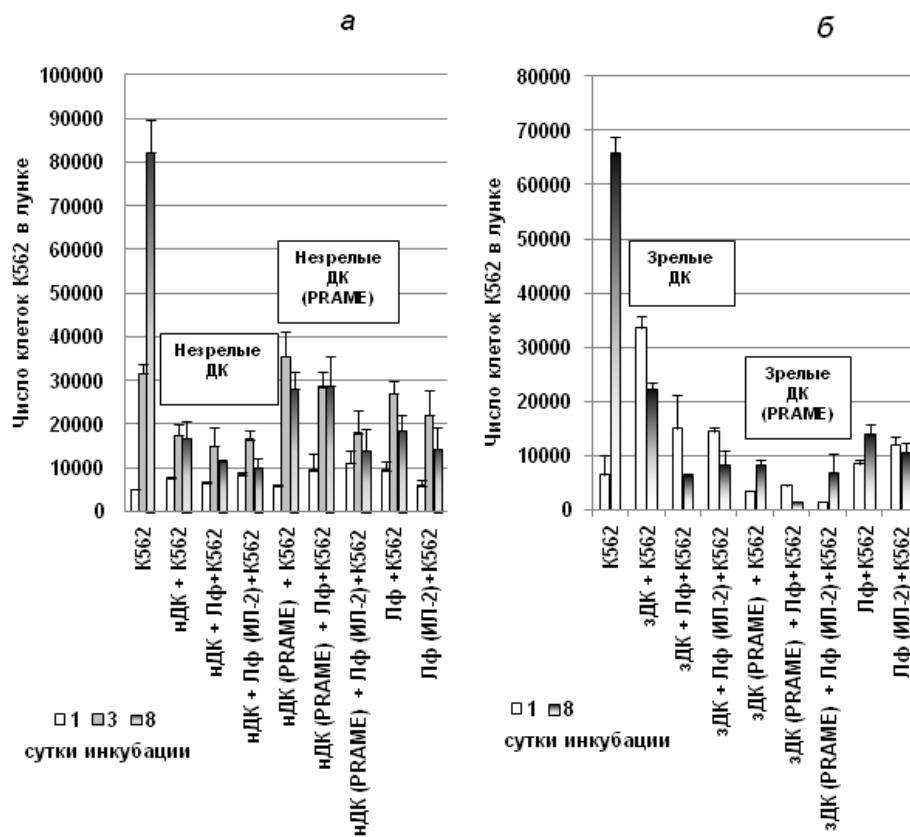


Рис. 4а-б. Рост клеток K562 при совместной инкубации с незрелыми и зрелыми дендритными клетками и лимфоцитами. Соотношение клеток при посеве $2,5 \times 10^4$ ДК : 5×10^5 K562, 5×10^4 Лф. Лф – лимфоциты, инкубированные в среде без ИЛ-2; Лф (ИЛ-2) – лимфоциты, инкубированные с 10 ед/мл ИЛ-2 до инкубации с ДК.

- а. нДК – инкубированные с 80 нг/мл ГМ-КСФ и 10 нг/мл ИЛ-4; нДК (PRAME) – инкубированные с ГМ-КСФ и ИЛ-4, затем нагружались белком PRAME;
- б. зДК – (PRAME) – зрелые клетки, нагруженные белком PRAME.

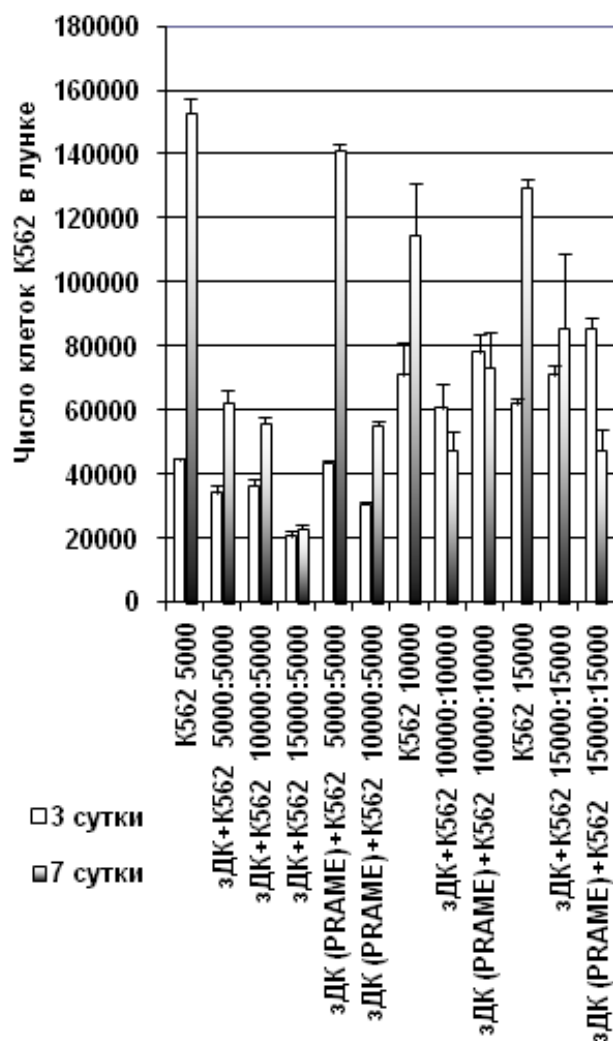


Рис. 5. Влияние дендритных клеток, полученных из костного мозга больного ОММЛ, на рост клеток K562 на 3 и 7 сутки совместной инкубации при разной плотности и соотношении клеток. Обозначения, как на рис. 1.

Другой важный вопрос, разрешённый нами, заключался в выборе формы антигена для стимуляции антипролиферативного эффекта ДК против чужеродных клеток. В качестве альтернативы нагрузки лизатом клеток линии K562 мы предложили использовать очищенный рекомбинантный белок PRAME. Из результатов видно, что ДК, нагруженные очищенным белком, всегда осуществляли больший антипролиферативный эффект против клеток-мишеней, чем ДК, ненагруженные, или нагруженные лизатом клеток K562. Согласно основным представлениям о функциях ДК, данные клетки могут презентировать в качестве антигенов практически любые пептиды, имеющие экзогенное происхождение. K562 содержат не только антигены белка PRAME, но и множество других из группы раково-тестикулярных антигенов, не говоря о наличии белков, кодируемых генами домашнего хозяйства. Из рассмотренных нами антигенов общим среди линий U937, THP-1, NOMO-1 и K562 оказалась только PRAME, геномная РНК которого экспрессировалась во всех линиях. Согласно профилю экспрессии, лизат клеток K562 может содержать пептиды белков GAGE, NY-ESO-1, MAGEA1, PASD1, SEMG1, SPANXA1 и PRAME. Данные антигены не могут находиться в клетках линий U937, THP-1 и NOMO-1, так как в них не происходит син-

теза мРНК генов.

Таким образом, ДК, захватив множество антигенов из смеси, полученной после лизиса K562, презентируют как эпитопы белка PRAME, так и эпитопы множества других белков. Концентрация белка PRAME не является преобладающей в лизате, а сам белок никогда не сравнится по чистоте с выделенным рекомбинантным белком. Однозначно, что ДК будут захватывать и презентировать большое количество белков, среди которых PRAME будет составлять незначительную долю. Не исключено, что лизат целых клеток содержит активные протеолитические ферменты, присутствие которых может стать губительным для ДК.

Мы видели, что антипролиферативный эффект, проявляемый ДК, нагруженными лизатом или очищенным белком, был сопоставимым при культивировании с K562 (рис 2). Эпитопы антигенов GAGE, NY-ESO-1, MAGEA1, PASD1, SEMG1 и SPANXA1 так же, как эпитопы PRAME, захватываются и расщепляются ДК.

Поскольку клетки линии K562 имеют набор этих антигенов, то в данном случае не могло наблюдаться каких-либо серьёзных различий в интенсивности антипролиферативного ответа.

Однако наличие этих антигенов в лизате не способствовало развитию более интенсивного, ли-

бо хотя бы сопоставимого антипролиферативного эффекта ДК против линий U937, THP-1 и NOMO-1, в клетках которых, как мы показали, антигенов GAGE, NY-ESO-1, MAGEA1, PASD1, SEMG1 и SPANXA1 быть не может.

Сила антипролиферативного ответа определялась только примесью белка PRAME, который содержится в лизате.

С другой стороны, антипролиферативный эффект ДК, обработанных чистым белком PRAME был более выражен против клеток U937, THP-1 и NOMO-1 (рис 2). В этих линиях происходит экспрессия гена PRAME, и наличие этого белка позволило ДК, нагруженным PRAME, проявить направленное антипролиферативное действие.

Таким образом, нагруженные белком PRAME ДК приобретают способность к антипролиферативному эффекту, который проявляется против PRAME⁺ клеток.

Вероятнее всего, именно по этой причине создание дендритноклеточной вакцины, где в качестве белка-мишени был выбран PRAME, завершилось неудачей при работе с клетками больного, имеющими низкий уровень экспрессии PRAME.

Литература

1. Абраменко И.В., Белоус Н.И., Крячок И.А. и др. Экспрессия гена PRAME при множественной миеломе // Терапевтический архив. – 2004. – Т. 76, № 7. – С. 77–81.
2. Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Соколова З.А., Косоруков В.С. Разработка липосомальной конструкции, содержащей лизат опухолевых клеток // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, №2. – С. 5.
3. Барышников А.Ю. Взаимодействие опухоли и иммунной системы организма // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4, №3. – С. 127–30.
4. Барышников А.Ю. Биотерапия опухолей: неудачи и перспективы // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2007. – № 1. – С. 13–6.
5. Барышников А.Ю. Принципы и практика вакцинотерапии рака // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2004. – № 2. – С. 59–63.
6. Барышников А.Ю. Противоопухолевые вакцины // Российский биотерапевтический журнал. – 2002. – Т. 1, № 2. – С. 12.
7. Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Кадагидзе З.Г. и др. Современные проблемы биотерапии злокачественных опухолей // Вестник Московского онкологического общества. – 2008. – № 1. – С. 6–10.
8. Гапонова Т.В., Менделеева Л.П., Мисюрин А.В. и др. Экспрессия опухолеассоциированных генов PRAME, WT1 и XIAP у больных множественной миеломой // Онкогематология. – 2009. – № 2. – С. 52–7.
9. Голубцова Н.В., Степанова Е.В., Бармашов А.Е. и др. Определение специфических противоопухолевых антител у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 3. – С. 25–8.
10. Мисюрин В.А. Аутосомные раково-тестикулярные гены // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 67–72.
11. Мисюрин В.А. X-хромосомные раково-тестикулярные гены // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 3–9.
12. Мисюрин В.А., Лукина А.Е., Мисюрин А.В. и др. Особенности соотношения уровней экспрессии генов PRAME и PML/RARA в дебюте острого промиелоцитарного лейкоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 9–16.
13. Мисюрин В.А., Мисюрин А.В., Кесаева Л.А. и др. Новые маркеры прогрессирования хронического миелолейкоза. Клиническая онкогематология // Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2014. – Т. 7, № 2. – С. 206–12.
14. Мисюрин В.А., Мисюрин А.В., Лукина А.Е. и др. Профили экспрессии раково-тестикулярных генов в клеточных линиях меланомы // Биологические мембраны. – 2014. – Т. 31, № 2. – С. 104–9.
15. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин // Вестник РАМН. – 2005. – № 7. – С. 37–40.
16. Михайлова И.Н., Петенко Н.Н., Чкадуа Г.З. и др. Вакцинотерапия метастатической меланомы с использованием дендритных клеток: клиническое исследование I/II фазы // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 39–43.
17. Михайлова И.Н., Петенко Н.Н., Демидов Л.В. Вакцинотерапия меланомы дендритными клетками // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 8–18.
18. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Клименко О.В. и др. Разработка липосомальной формы противоопухолевой вакцины // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 62–6.
19. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Багирова Н.С. и др. Стерилизация многослойных протеолипосом // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 1. – С. 13–7.

Выводы

Несмотря на недостаток фактов, которые могли бы нам раскрыть механизм антипролиферативного действия ДК, у нас есть все основания для подтверждения того, что ключевым звеном в этом эффекте является наличие антигена, связывающего как ДК, так и клетку-мишень. Антиген должен экспрессироваться клеткой-мишенью, и в то же время им должны быть нагружены ДК. Наибольший эффект наблюдался при антипролиферативном действии ДК, нагруженных специально очищенным от нежелательных примесей белком PRAME, активно экспрессирующим этот ген. И наибольший антипролиферативный эффект наблюдается при нагрузке целевым антигеном зрелых ДК.

Мы полагаем, что при создании дендритноклеточных вакцин оптимальным решением является нагрузка целевым антигеном в форме очищенного белка зрелых ДК, и использование их против опухолей, чьи клетки позитивны по антигену, выбранному в качестве целевого. Оптимальным временем применения дендритноклеточной вакцины является состояние, когда различными способами достигается минимальный размер опухолевой массы.

20. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Бурова О.С. и др. Сравнение уровня экспрессии HSP70 на клеточных линиях меланомы // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 43–8.
21. Никитин К.Д., Барышников А.Ю. Противоопухолевые вакцины на основе белков теплового шока // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 3–12.
22. Новиков В.В., Барышников А.Ю., Караулов В.А. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы // Иммунология. – 2007. – № 4. – С. 249–54.
23. Новиков В.В., Гостюжова Е.А., Караулов А.В. и др. Состояние пула растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы при острых лейкозах // Российский иммунологический журнал. – 2009. – Т. 3(12), № 2. – С. 164–70.
24. Новиков В.В., Евсегнеева И.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы при социально значимых инфекциях // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 100–5.
25. Новиков В.В., Евсегнеева И.В., Караулов В.А., Барышников А.Ю. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы при социально значимых инфекциях. Исследование их роли при вирусных инфекциях // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 3. – С. 131–45.
26. Новиков В.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. и др. Особенности структурного пула растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы // Молекулярная медицина. – 2009. – № 4. – С. 27–33.
27. Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Буркова А.А. и др. Адаптирование методики культивирования дендритных клеток человека из моноцитов периферической крови для клинического применения // Российский биотерапевтический журнал. – 2002. – Т. 1, № 3. – С. 56–62.
28. Anguille S., Lion E., Tel J. et al. Interleukin-15-induced CD56(+) myeloid dendritic cells combine potent tumor antigen presentation with direct tumoricidal potential // PLoS One. – 2012. – 7. – e51851-1-e51851-13.
29. Asavaroengchai W., Kotera Y., Mule J.J. Tumor lysate-pulsed dendritic cells can elicit an effective antitumor immune response during early lymphoid recovery // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2002. – 99. – P. 931–6.
30. Chapoval A.I., Tamada K., Chen L. In vitro growth inhibition of a broad spectrum of tumor cell lines by activated human dendritic cells // Blood. – 2000. – 95. – P. 2346–51.
31. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal Biochem. – 1987. – 162. – P. 156–9.
32. Fraszczak J., Trad M., Janikashvili N. et al. Peroxynitrite-Dependent Killing of Cancer Cells and Presentation of Released Tumor Antigens by Activated Dendritic Cells // J. Immunol. – 2010. – 184. – P. 1876–84.
33. Lakomy D., Janikashvili N., Fraszczak J. et al. Cytotoxic Dendritic Cells Generated from Cancer Patients // J. Immunol. – 2011. – 187. – P. 2775–82.
34. Matheoud D., Perie L., Hoeffel G. et al. Cross-presentation by dendritic cells from live cells induces protective immune responses in vivo // Blood. – 2007. – 115. – P. 4412–20.
35. Michailova I.N., Morozova L.Ph., Golubeva V.A. et al. Cancer/testis genes expression in human melanoma cell lines // Melanoma Research. – 2008. – № 5. – P. 303–13.
36. Pan K., Zhao J.J., Wang H. et al. Comparative Analysis of Cytotoxic T Lymphocyte Response Induced by Dendritic Cells Loaded with Hepatocellular Carcinoma-Derived RNA or Cell Lysate // Int. J. Biol. Sci. – 2010. – 6. – P. 639–48.
37. Rega A., Terlizzi M., Luciano A. et al. Plasmacytoid Dendritic Cells Play a Key Role in Tumor Progression in Lipopolysaccharide-Stimulated Lung Tumor-Bearing Mice // The Journal of Immunology. – 2013. – 190. – P. 2391–402.
38. Roothans D., Smits E., Lion E., Tel J., Anguille S. CD56 marks human dendritic cell subsets with cytotoxic potential // Oncoimmunology. – 2013. – 2. – e23037-1-e23037-3.
39. van Baren N., Chambost H., Ferrant A. et al. PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukaemia cells // Br J Haematol. – 1998. – 102(5). – P. 1376–9.
40. Wesa A.K., Storkus W.J. Killer dendritic cells: mechanisms of action and therapeutic implications for cancer // Cell Death Differ. – 2008. – 15. – P. 51–7.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АПК – антиген-презентирующие клетки
 ЛПС – липополисахарид
 РТГ – раково-тестикулярный ген
 ИЛ-2 – интерлейкин-2
 ИЛ-4 – интерлейкин-4
 ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
 КМ – костный мозг
 ОММЛ – острый миеломоноцитарный лейкоз
 ОК – опухолевые клетки
 ДК – дендритные клетки (DC – dendritic cells)
 зДК – зрелые дендритные клетки;
 зДК – зрелые дендритные клетки, нагруженные белком PRAME (по 8 мкг/мл среды);
 нДК – незрелые дендритные клетки, инкубировались в среде без цитокинов.

УДК 611.013.68.08:616-006.484-092.4

И.С. Брюховецкий^{1, 2}, А.С. Брюховецкий^{1, 3}, П.В. Мищенко², Е.В. Толок², Р.Ю. Хотимченко²**МИГРАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА
К КЛЕТКАМ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЛИНИИ U87 IN VITRO**¹Дальневосточный федеральный университет, Школа биомедицины (690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8²ФГБУН Институт биологии моря имени А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН, Владивосток³Клиника восстановительной и интервенционной неврологии «Нейровита», Москва**Контактная информация**

Брюховецкий Игорь Степанович, с.н.с. лаборатории молекулярной и клеточной нейробиологии Школы биомедицины ДВФУ; н.с. лаборатории фармакологии ФГБУН Институт биологии моря имени А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН, кандидат медицинских наук

адрес: 690091, г. Владивосток, улица Суханова д. 8; тел. +7(914)723-05-03.

e-mail: bruhovetsky@mail.ru

Статья поступила 08.10.2014, принята к печати 24.11.2014.

Резюме

Феномен миграции стволовых клеток в опухолевый очаг открывает перспективы создания новых терапевтических технологий в онкологии. ГСК, обладающие большим репаративным потенциалом, могут быть использованы для оптимизации схем лечения опухолей мозга.

Цель работы состояла в получении экспериментальных данных, свидетельствующих о способности ГСК к направленной миграции к клеткам глиомы.

В работе использовали клетки глиобластомы человека линии U87, культуры ГСК и фибробластов человека. Клетки кокультивировали в течение пяти дней. В ходе эксперимента наблюдали формирование клеточного вала из гемопоэтических стволовых клеток по периметру культуральной вставки, содержащей клетки глиомы. Такую картину не наблюдали в среде с фибробластами. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ГСК обладают собственным потенциалом направленной миграции к клеткам глиомы U87.

Ключевые слова: глиальные опухоли, глиобластома, гемопоэтические стволовые клетки, клеточная миграция.

I.S. Bryukhovetskiy^{1, 2}, A.S. Bryukhovetskiy^{1, 3}, P.V. Mischenko², E.V. Tolok², R.Yu. Khotimchenko²**MIGRATION OF HUMAN HEMATOPOIETIC STEM CELLS
TO THE GLIOBLASTOMA IN VITRO**¹School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok²A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok³Clinic of Restorative and Interventional Neurology «NeuroVita», Moscow**Abstract**

Phenomenon directed migration of stem cells in the tumor tissue bodes well for the creation of new therapeutic technologies. HSCs are the least involved in the carcinogenesis of malignant gliomas have a great reparative potential and can be used to optimize treatment regimens malignant glial brain tumors.

Aim of the experimental substantiation HSCs ability to directional migration of glioblastoma cells. In this study we used human glioblastoma line U87, the culture of HSCs, and human fibroblasts. Cells were cultured five days. Experiments revealed the formation of cellular HSCs shaft perimeter culture inserts containing culture glioma. This picture is not observed in the wells with the cultures of fibroblasts.

These results indicate that HSCs have high potential directional migration of glioma cells U87; it allows us to consider them as promising lines for development of new anticancer biomedical technology and sheds light on previously unknown aspects of carcinogenesis glial tumors.

Key words glial brain tumors, Glioblastoma multiforme, hematopoietic stem cells, neural stem cells, tumor cells, cell migration.

Введение

СК – магистральный тренд в развитии современных биотехнологий и новая клиническая реальность мировой трансляционной и регенеративной медицины.

Трансплантация СК коренным образом изменила базовые терапевтические подходы к лечению сосудистых и нейродегенеративных заболеваний, модифицировала основные протоколы лечения травм центральной нервной системы [18] и терапии ряда фатальных онкогематологических заболеваний [13]. Она стала новой теоретической и методологической платформой для создания новаторских биомедицинских технологий [1; 7; 8; 12].

Несмотря на значительные успехи, на пути широкого внедрения клеточных технологий в повседневную клиническую практику перед регенеративной медициной стоит целый ряд нерешенных этических, юридических, религиозных задач и технологических ограничений. Наиболее сложным и важным аспектом проблемы применения СК в клинике является потенциальная возможность неопластической трансформации клеточного трансплантата и развитие злокачественного онкологического заболевания из трансплантированных СК [19]. Опасность неопластической трансплантации СК после их введения в организм вынудила ведущие клиники мира практически отказаться от использования эмбрионального и фетального клеточного

материала, культивирования СК, использования клеток с индуцированной iPSCs и сосредоточиться только на использовании аутологических СК [7]. Вынужденные меры возымели определенный успех для клиники, однако они не значительно уменьшили степень сопутствующего риска для пациентов, поскольку механизмы неопластической трансформации СК в опухолевые СК и специфика взаимодействия СК с опухолью до настоящего времени остаются еще не достаточно ясными и понятными.

Феномен таргетной (целенаправленной) миграции СК в опухолевый очаг, описанный научной группой Карен Эбоди [11], пролил свет на ряд очень важных аспектов этой проблемы. Рост опухоли в мозге или в любом другом органе приводит к повреждению тканей и запуску экспрессии генов семейства HIF, которые регулируют продукцию цитокинов, привлекающих СК [6; 22].

Идентифицировано более 80 лигандов, управляющих процессом миграции СК через соответствующие рецепторы [2; 3; 6]. Наиболее изучено взаимодействие фактора стромальных клеток SDF-1 α с рецептором CXCR4 [15], фактора стволовых клеток SCF с рецептором c-Kit, фактора роста гепатитов HGF с рецептором c-Met, фактора роста эндотелия сосудов VEGF с VEGFR, белка хемоаттрактанта моноцитов MCP-1 с CCR2, ядерного белка амфотерина HMGB1 с RAGE и урокиназы плазминогена с uPAR [4; 6; 9; 19; 20].

Согласно данным литературы [5], основным источником цитокинов, привлекающих СК в опухоль, являются дегенерирующие ткани клеточного микроокружения опухоли, соответственно, сам феномен миграции СК в область неопластического повреждения длительное время исследователями рассматривался только как саногенетический процесс [19; 22]. Однако не решен важнейший вопрос фундаментальной биологии опухолей: может ли сама опухолевая ткань привлекать СК без участия окружающих тканей. И второе, какие клеточные и молекулярные механизмы канцерогенеза лежат в основе данного межклеточного взаимодействия?

Цель настоящей работы состояла в получении экспериментальных данных и неопровержимых доказательствах способности ГСК человека к направленной миграции к клеткам глиобластомы линии U87 *in vitro*.

Материалы и методы

Гемопоэтические стволовые клетки

Культура ГСК была представлена ЗАО «Клиника восстановительной и интервенционной неврологии и терапии «Нейровита» (Москва).

Согласно сопроводительной документации, с целью увеличения количества стволовых клеток в периферической крови донор получал 8 инъекций Г-КСФ с интервалом 12 ч в течение 4 дней. В первые три дня доза Г-КСФ составляла 2,5 мкг/кг массы тела, а в последний день удваивалась. Сбор стволовых клеток из периферической крови проводили с помощью аппарата COBE® Spectra Apheresis System. Выделение клеток CD34⁺/CD45⁺ фенотипа осуществляли методом иммуномагнитной сепарации на разделительной колонке autoMACS™Pro.

Сбор материала осуществлялся для лечения нейроонкологических больных. Использование материала в исследовательских целях проводилось с согласия пациента.

После размораживания клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% FBS, FGF,

EGF и антибиотик-антимикотик (производитель – Gibco®). Перед внесением в смешанную культуру ГСК были обработаны флуоресцирующим красителем CellTracker™ Red CMTPX (производитель – Molecular Probes®).

Культура клеток глиобластомы человека линии U87

Глиобластома человека линии U87 MG была предоставлена «Национальным институтом регенеративной медицины» (Москва). Данная линия получена от 44-летнего пациента и входит в Американскую коллекцию клеточных культур «ATCC» под номером HTB-14 [14].

Клетки размораживали в течение 10 мин при +37 °С, отмывали от ДМСО средой DMEM, содержащей 10% FBS, антибиотик-антимикотик «100X» (все производства компании Gibco®). Клетки осаждали центрифугированием, добавляли свежую среду и ресуспендировали.

Далее, клетки культивировали до образования монослоя, затем, снимали с помощью ферментативной диссоциации (0,05 %-ный trypsin-EDTA, 1 : 4 при +37 °С, 10 мин) и центрифугировали (120g, 6 мин). Супернатант сливали, добавляли свежую среду и ресуспендировали.

С целью визуализации клетки обрабатывали флуоресцентным маркером Vybrant® CFDA SE Cell Tracer (производитель – компания Molecular Probes®).

Фибробласты

В работе использовали первичную культуру фибробластов человека (предоставлена компанией Life Technology). Клетки размораживали согласно стандартному протоколу и культивировали в полной среде DMEM/F12, NEMES, содержащей 10% FBS, 2 mM L-глутамин, 0,8 % глюкозы, 0,2 ЕД/мл инсулина и антибиотик-антимикотик (все производства компании Gibco®). Перед внесением в культуру фибробласты обработаны флуоресцирующим красителем CellTracker™ Red CMTPX (производитель – компания Molecular Probes®).

Дизайн эксперимента

Для создания сочетанных культур использовали культуральные вставки (Millipore) \varnothing 12 мм с размером пор 0,4 мкм. В каждую лунку 12-луночного культурального планшета помещали вставку, которую иммобилизовали каплей стерильного парафина. Внутрь культуральной вставки вносили равное количество ($0,5 \times 10^6$) клеток линии глиомы U87 и фибробластов (рис. 1).

Планшет с культуральными вставками инкубировали в течение 24 ч, затем на дно лунки планшета высаживали по $0,25 \times 10^6$ ГСК. Через 3 ч инкубации клетки, не прикрепившиеся к дну лунки, отбирали. Подсчет клеток в области проекции мембраны культуральной вставки осуществляли в полностью автоматизированном режиме с использованием системы Cell-IQ (CM-Technologies) первого по пятый дни эксперимента.

В работе использовали систему визуализации живых клеток LSM 5 Karl Zeiss Pascal и конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Carl Zeiss LSM. Для работы с изображениями применялись программы 3D for LSM Version 1.4.2, ImageJ (США). Статистическая обработка полученных данных проведена с применением экстенсивных коэффициентов и коэффициентов относительной интенсивности.

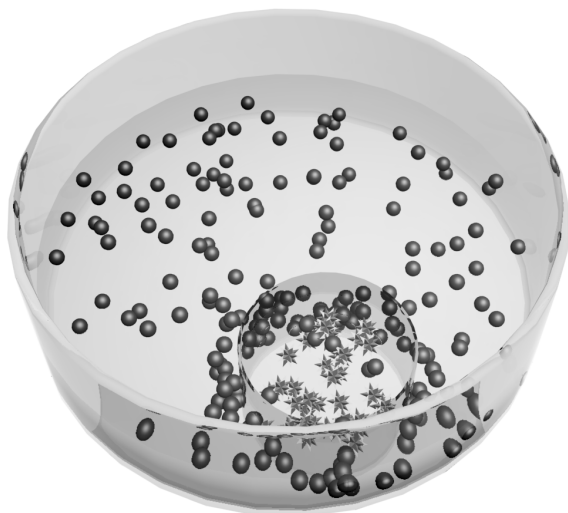


Рис. 1. Схема лунки культурального планшета. Зеленый – клетки глиомы, внесенные в культуральную вставку; красный – гемопоэтические стволовые клетки, внесенные в культуру.

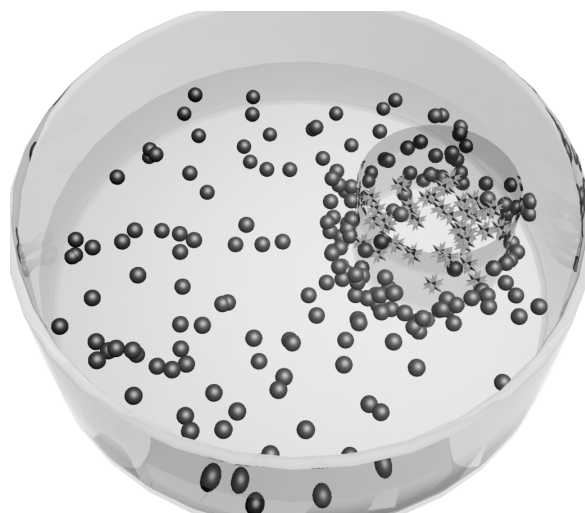


Рис. 5. Общая схема эксперимента, основная идея – формирование клеточного вала по периметру полупроницаемой культуральной вставки.

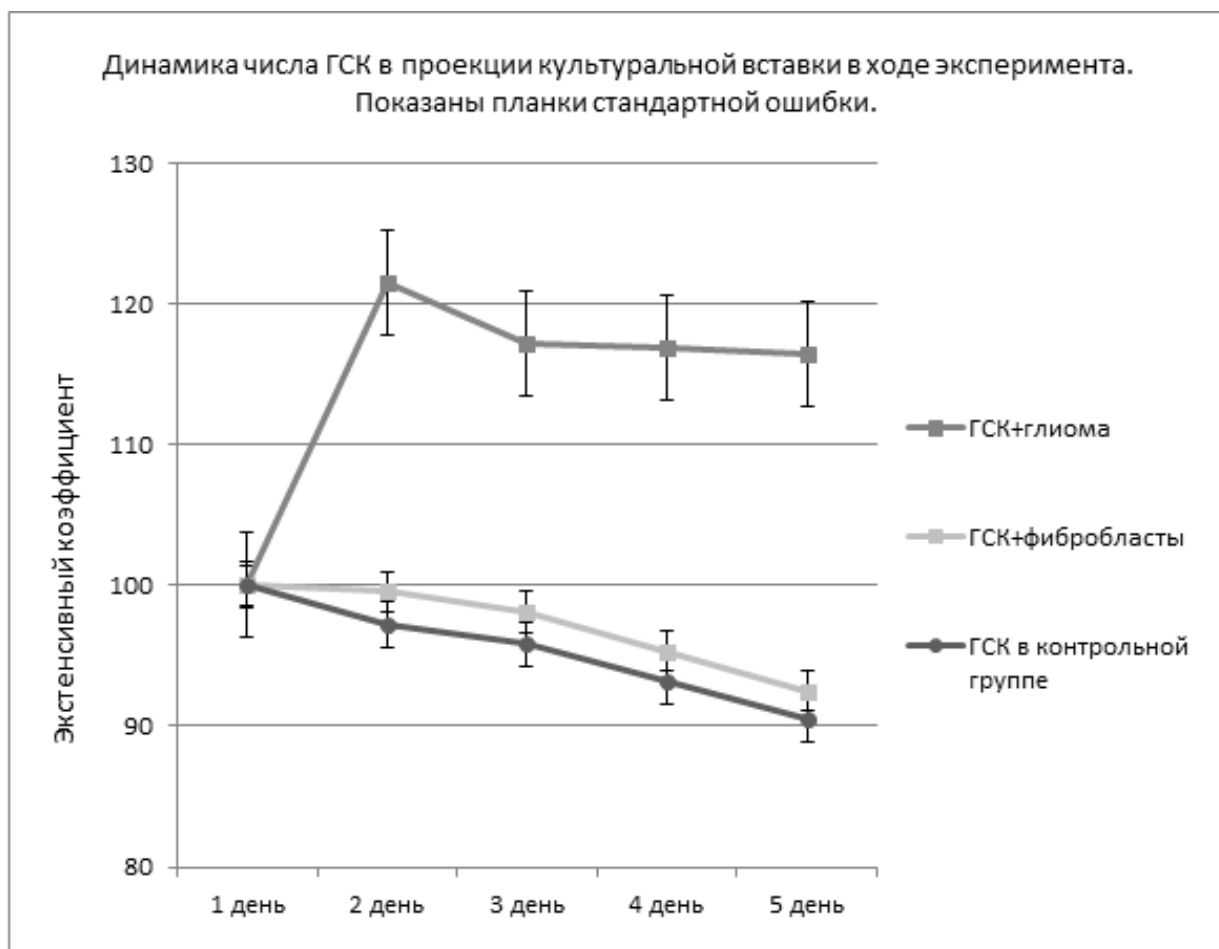


Рис. 6. Динамика числа ГСК в области культуральной вставки сов ходе эксперимента.

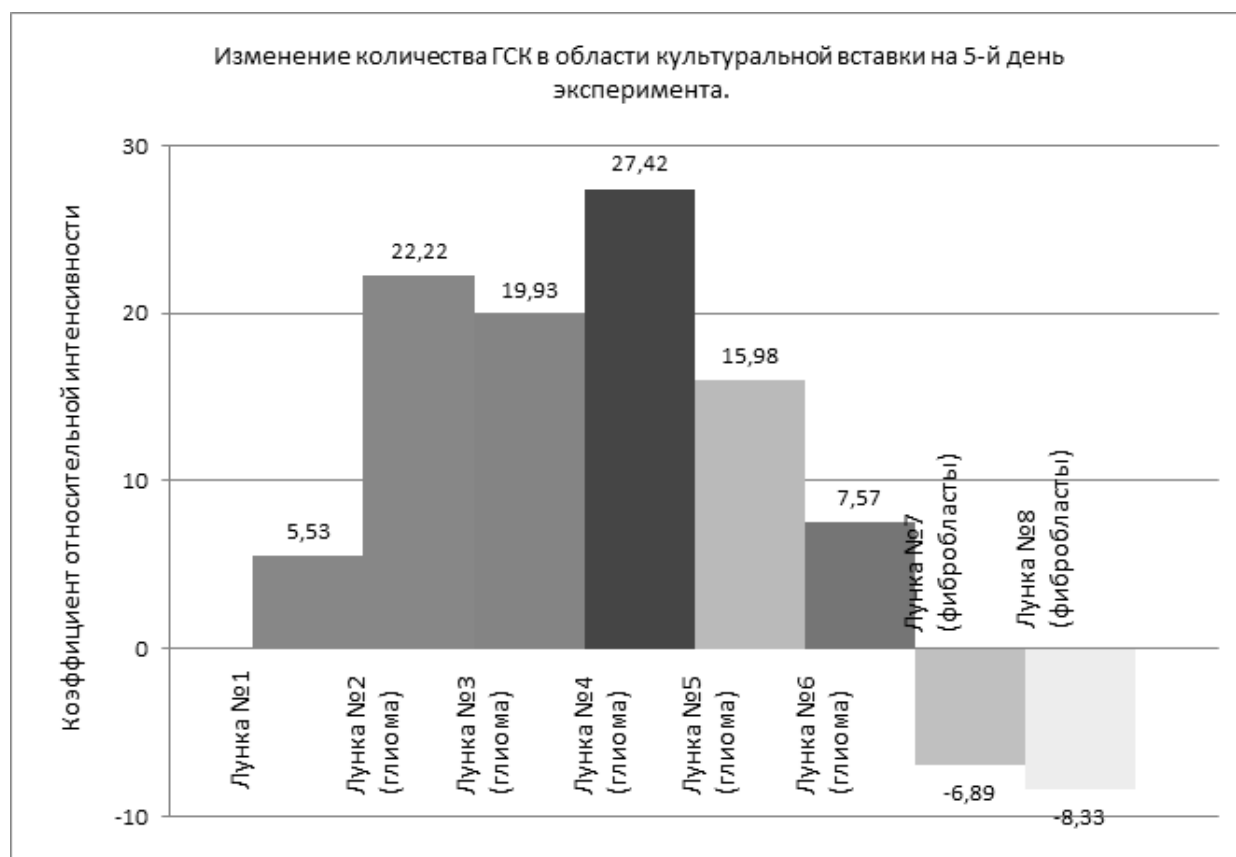


Рис. 7. Изменение числа ГСК в области культуральной вставки на 5 день эксперимента.

Экспериментальная часть работы была одобрена Комиссией по биомедицинской этике Школы биомедицины ДВФУ.

Результаты

При окрашивании реагентом Vybrant® CFDA SE Cell Tracer клетки глиомы U87 приобретали устойчивую флуоресценцию (рис. 2; см. обложку) и визуализировались в виде образований или слегка вытянутой формы. ГСК и фибробласты окрашенные CellTracker™ Red CMTPX, также активно флуоресцировали в смешанной культуре (рис. 3).

Спустя двое суток наблюдений клетки глиобластомы сформировали монослой. В свою очередь, в сочетанной культуре с ГСК отмечалась отчетливая тенденция к формированию клеточного вала, располагавшихся по периметру культуральной вставки, содержащей культуру глиомы U87 (рис. 4; 5). Достигая максимума к третьему дню эксперимента, данный феномен отсутствовал в сочетанных культурах с фибробластами, что демонстрирует способность глиобластомы человека активно привлекать СК.

Можно предположить, что направленная миграция ГСК к клеткам глиобластомы обусловлена продукцией цитокинов и хемоаттрактантов, первичным источником которых являются именно опухолевые клетки.

Доказано, что глиомы продуцируют тенасцин, фибронектин, ламинин, различные типы коллагена и ряд других биологически активных молекул, привлекающих стволовые клетки [16; 20; 21].

Подсчет количества ГСК, окрашенных флуоресцентным маркером CellTracker™ Red

CMTPX, показал достоверное ($p \leq 0,05$) увеличение количества ГСК в области мембраны во всех сочетанных культурах, содержащих клетки глиомы, начиная со второго дня эксперимента. Значимых изменений числа ГСК в области культуральной вставки в кокультуре с фибробластами не наблюдали (рис. 6). Увеличение числа ГСК в проекции культуральной вставки было достоверным во всех лунках содержащих клетки глиобластомы (рис. 7).

Обсуждение

На сегодняшний день существует две теории интерпретирующие процессы канцерогенеза – в виде вероятностной и иерархической моделей. Согласно первой, все клетки опухоли обладают одинаковым онкогенным потенциалом [23]. Вторая же гласит, что среди всех этих клеток лишь небольшое подмножество, «боковая популяция», способная порождать новые опухоли [20]. Очевидно, кроме первичной пролиферации под онкогенным потенциалом следует понимать способность привлекать здоровые СК и вовлекать их в процессы канцерогенеза.

Например, мультиформная глиобластома, как явствует из названия, гетерогенна как никакая другая опухоль, и содержит клетки самых разных типов. Поскольку большинство клеток опухоли характеризует конкретный профиль генетических нарушений, логично предположить, что клетка, из которой они произошли, обладала способностью порождать клетки разных типов, то есть СК.

Как следует из эксперимента, клетки глиобластомы способны сами привлекать СК. Очевидно, этот механизм и запускает неопластический рост, а возникающее в процессе опухолевой инвазии по-

вреждение окружающих тканей сопровождается нарушением их метаболизма и гипоксией, что ведет к продукции цитокинов усиливающих процессы направленной миграции опухолевых клеток.

В естественных условиях, в мозге, основным источником СК становятся герминативные центры – субвентрикулярная зона и зубчатая извилина. При появлении в паренхиме мозга опухоли в герминативных зонах резко усиливаются пролиферативные процессы, а через 14 дней выявляется резкое снижение общего количества клеток [24; 26].

Очевидно, этот процесс только отчасти носит регуляторный характер, и скорее всего, объясняет преобладание опухолей во второй половине жизни, когда количество СК в субвентрикулярной зоне резко сокращается [22]. В этих условиях, рекрутируя нейральные стволовые клетки (НСК) опухоль их аккумулирует, стимулирует экспрессию онкогенов, тем самым используя их репликативный и миграционный потенциал [4; 25].

Нашей исследовательской группой выполнен глубокий анализ литературы по вопросам миграции СК к очагу злокачественных опухолей [4; 6]. Не вызывает сомнений, что СК, введенная в организм с опухолью, неизбежно найдёт неопластический

очаг. Следует предположить, что дальнейшая судьба СК в этом случае всецело будет зависеть от глубины изменений генома вызванных мутационными процессами. Сопоставление протеомного профиля НСК и опухолевой СК глиобластомы линии U 87 позволяет сделать вывод о глубоких изменениях в экспрессии генов, вызванных процессами канцерогенеза [5].

Заключение

ГСК человека, в отличие от НСК, менее подвержены мутационным изменениям и могут рассматриваться в качестве перспективной клеточной линии для лечения нейроонкологических заболеваний и травм мозга.

Таким образом, клетки глиобластомы человека линии U87 обладают способностью привлекать СК, что позволяет отнести феномен направленной миграции к фундаментальным механизмам канцерогенеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 14.575.21.0038)

Литература

1. Алексеева И.С., Кулаков А.А., Гольдштейн Д.В. и др. Результаты клинико-экспериментального исследования по использованию комбинированного клеточного трансплантата на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани для восстановления дефектов костной ткани // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 67–9.
2. Барышников А.Ю. Взаимодействие опухоли и иммунной системы организма // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4, № 3. – С. 127–30.
3. Боценовский В.А., Барышников А.Ю. Молекулы клеточной адгезии // Успехи современной биологии. – 1994. – Т. 114, № 6. – С. 741.
4. Брюховецкий И.С., Брюховецкий А.С., Кумейко В.В. и др. Стволовые клетки в канцерогенезе мультиформной глиобластомы // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. 8, № 2. – С. 13–9.
5. Брюховецкий А.С., Шевченко В.Е., Чехонин В.П. и др. Сравнительное протеомное картирование опухолевых стволовых клеток, выделенных из глиобластомы линии U 87, нейрональных стволовых и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека: от каталогизации клеточных белков к инновационной парадигме протеом-основанной клеточной терапии опухолей // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. 8, № 2. – С. 85–92.
6. Брюховецкий И.С., Брюховецкий А.С., Мищенко П.В. и др. Роль системных механизмов миграции и хоуминга стволовых клеток в развитии злокачественных опухолей центральной нервной системы и разработке новых методов противоопухолевой терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 3–12.
7. Брюховецкий А.С. Клеточные технологии в нейроонкологии: циторегуляторная терапия глиальных опухолей головного мозга. – М.: Издательская группа РОНЦ, 2011. – 652 с.
8. Киселевский М.В., Ситдикова С.М., Тенчурин Т.Х., Хомченко А.М. Современные подходы и перспективы создания биоимплантантов трахеи // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 127–31.

9. Уласов И.В., Каверина Н.В., Кадагидзе З.Г., Барышников А.Ю. Антиглиомная аденовирусная виротерапия: механизм, регуляция и клинические перспективы // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 11–8.
10. Уласов И.В., Каверина Н.В., Барышников А.Ю. Роль сурвивина в диагностике и терапии опухолей головного мозга // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 71–6.
11. Aboody K.S., Brown A., Rainov N.G. et al. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: Evidence from intracranial gliomas // PNAS. – 2000. – 97(23). – P. 12846–51.
12. Barth R.F., Kaur B. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas // J. Neurooncol. – 2009. – 94(3). – P. 299–312.
13. Bordignon C. Progress Stem-cell therapies for blood diseases // Nature. – 2006. – 441(7097). – P. 1100–2.
14. Cheng W.Y., Chiao M.T., Liang Y.J. et al. Luteolin inhibits migration of human glioblastoma U-87 MG and T98G cells through downregulation of Cdc42 expression and PI3K/AKT activity // Mol. Biol. Rep. – 2013. – 40(9). – P. 5315–26.
15. Greenbaum A., Hsu Y.M., Day R.B. et al. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for hematopoietic stem-cell maintenance // Nature. – 2013. – 495(7440). – P. 227–30.
16. He J., Liu Y., Lubman D.M. Targeting glioblastoma stem cells: cell surface markers // Curr. Med. Chem. – 2012. – 19(35). – P. 6050–5.
17. Kelaini S., Cochrane A., Margariti A. Direct reprogramming of adult cells: avoiding the pluripotent state // Stem Cells Cloning. – 2014. – 7. – P. 19–29.
18. Lindvall O., Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders // Nature. – 2006. – 441(7097). – P. 1094–6.
19. Lok C. Stem-cell research: Never say die // Nature. – 2012. – 481(7380). – P. 130–3.
20. Ozawa K., Sato K., Oh I. et al. Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs) // J. Autoimmun. – 2008. – 30(3). – P. 121–7.
21. Piccirillo S.G., Binda E., Fiocco R., Shah K. Brain cancer stem cells // J. Mol. Med. (Berl.). – 2009. – 87(11). – P. 1087–95.
22. Silva-Vargas V., Crouch E.E., Doetsch F. Adult neural stem cells and their niche: a dynamic duo during homeostasis, regeneration, and aging // Curr. Opin. Neurobiol. – 2013. – 23(6). – P. 935–42.
23. Sonnenschein C., Soto AM. Theories of carcinogenesis: an emerging perspective // Semin Cancer Biol. – 2008. – 18(5). – P. 372–7.
24. Walzlein J.H., Synowitz M., Engels B. et al. The antitumorigenic response of neural precursors depends on subventricular proliferation and age // Stem Cells. – 2008. – 26(11). – P. 2945–54.
25. Zhao D., Najbauer J., Annala J.A. et al. Human neural stem cell tropism to metastatic breast cancer // Stem cells. – 2012. – 30. – P. 314–25.
26. Zhao D., Najbauer J., Garcia E. et al. Neural stem cell tropism to glioma: critical role of tumor hypoxia // Mol Cancer Res. – 2008. – 6(12). – P. 1819–29.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

GСК	– гемопоэтические стволовые клетки (HSCs – Hematopoietic stem cells)
Г-КСФ	– гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
СК	– стволовые клетки
НСК	– нейральные стволовые клетки
HIF	– hypoxia-inducible factor
iPSCs	– плюрипотентность

УДК 611.018.4/6:616-003.93:57.08

*А.И. Лебедева***АЛЛОГЕННЫЙ ГУБЧАТЫЙ БИОМАТЕРИАЛ –
ИНГИБИТОР ФИБРОЗА ПОВРЕЖДЕННОЙ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ***ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» МЗ РФ, Уфа***Контактная информация***Лебедева Анна Ивановна, к.б.н., старший научный сотрудник отдела морфологии***адрес:** 450075 Уфа, ул. Р. Зорге, 67/1; **тел.** (347)2934235**e-mail:** jeol02@mail.ru

Статья поступила 23.09.2014, принята к печати 24.11.2014.

Резюме

Применение аллогенного губчатого биоматериала при глубоком повреждении скелетной мышцы способствует полному восстановлению дефекта. Продукты биодеградации биоматериала ингибируют профиброгенную клеточную активность (TGF-β1, FGF-β, Vimentin) и снижают скорость коллагенообразования, тем самым стимулируют миогистогенез. В группе животных без использования биоматериала в результате заживления дефекта происходило образование рубца с дальнейшим перерождением в жировую ткань. Использовались гистологические, иммуногистохимические и электронномикроскопические методы исследования.

Ключевые слова: аллогенный губчатый биоматериал, регенерация, фиброгенные цитокины, скелетная мышечная ткань.

*A.I. Lebedeva***ALLOGENEIC SPONGIFORM BIOMATERIAL
– FIBROSIS INHIBITOR OF THE DAMAGED SKELETAL MUSCULAR TISSUE***FSBI «Russian Eye and Plastic Surgery Center» of the Health Ministry of the Russian Federation, Ufa***Abstract**

The use of allogeneic spongiform biomaterial in deep damaged skeletal tissue contributes to complete defect restoration. The biomaterial biodegradation products inhibit profibrogenic cellular activity (TGF-β1, FGF-β, Vimentin) and reduce collagen formation speed, thereby stimulate myohistogenesis. During the defect restoration process, scarring formation with further degeneration into adipose tissue took place in a group of animals when there were not used the biomaterial. Histological, immunohistochemical and electron microscopic methods of the investigation were used.

Key words: allogenic biomaterial sponge, regeneration, fibrogenic cytokines, skeletal muscle tissue.

Введение

Как правило, глубокие повреждения скелетной мышцы вызывают воспалительную реакцию, исходом которой является формирование рубца [3]. Существующие технологии коррекции мышечных дефектов – аутопластика, аллопластика, ксенопластика, клеточные технологии, генная терапия – являются трудоемкими, травматичными и сопряжены с осложнениями [2].

Одним из перспективных направлений в регенеративной медицине является тканевая инженерия с использованием биодеградируемых трансплантатов [4].

При их применении необходимо учитывать степень фиброобразования регенерата. Разработанные в ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» МЗ РФ биоматериалы Аллоплант (Патент РФ на изобретение №2189257, ТУ 9398-001-04537642-2011) изготавливаются из кадаверной аллогенной волокнистой соединительной ткани, после имплантации биодеградируют, а продукты резорбции (коллаген и протеогликаны) являются эффективными биостимуляторами клеточных элементов и регуляторами паранхиматозно-стромальных взаимодействий [6; 7].

Цель исследования – определение фиброгенных факторов в скелетной мышечной ткани и раскрытие морфологических аспектов регенерации после пластики дефекта АГБ.

Материалы и методы

Для исследования использовали половозрелых аутбредных крыс линии Wistar обоего пола массой от 0,18 до 0,2 кг. Животные были получены из питомника лабораторных животных Рапполово. Работу проводили с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза от 13 ноября 1984 г. №724). В контрольной группе (n=36) производилось выделение икроножной мышцы, а также малоберцового нерва, который не повреждали. В икроножной мышце моделировали дефект длиной 3–4 мм, который ушивали викрилом. В опытной группе (n=36) в аналогичный дефект укладывали АГБ соответствующих размеров и фиксировали викрилом. Из опыта животных выводили путем инсультной дозы паров фторотана. Забор аутопсийного материала проводили через 3; 7; 14; 30; 60 и 90 суток после эксперимента. Кусочки ткани фиксировали в 10 %-ном р-ре нейтрального формалина, обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике. Гистологические срезы готовили на микротоме LEICA RM 2145 (Германия), окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван Гизону, по Маллори. Для иммуногистохимических исследований парафиновые срезы толщиной 4 мкм окрашивали с помощью иммуногистостейнера Leica Microsystems Bond™ (Германия).

В качестве первичных антител применяли: трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), vimentin, фактор роста фибробластов $\beta 1$ (FGF $\beta 1$) в разведении 1:300 (Santa Cruz Biotechnology, США). Для демаскировки использовали непрямую стрептавидин-биотинную систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия). Оценку специфичности реакции проводили при окрашивании срезов без первичных антител. Подсчет клеток производили в 20 полях зрения каждого образца ($n=6$) при увеличении $\times 400$. Исследование и визуализацию препаратов проводили с использованием микроскопа Leica DMD 108 (Германия) со специализированным программным обеспечением управления настройками и захвата изображения. Для электронномикроскопического исследования кусочки тканей фиксировали в 2,5%-ном растворе глутаральдегида, приготовленного на какодильном буфере (pH 7,2–7,4) с дофиксацией в 1 %-ном растворе OsO_4 на том же буфере. Материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в эпон-812 по общепринятой методике. Предварительно готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окрашивали их толуидиновым синим на 2,5%-ном растворе безводной соды. На данных срезах выбирали участки для электронномикроскопического исследования. Полутонкие и ультратонкие срезы готовили на ультратоме EM UC 7 (Leica, Германия). Ультратонкие срезы контрастировали 2%-ным водным раствором уранил-ацетата, цитратом свинца по Рейнольдсу и изучали в трансмиссионном микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Для обработки числовых данных использовали параметрический дисперсионный анализ по Р. Фишеру при помощи критерия Fd и непараметрический (ранговый) дисперсионный анализ по Краскелу-Уоллесу с использованием для сравнения отдельных выборок рангового U-критерия [12].

Результаты и обсуждение

После резекции мышцы в контрольной группе через 7–14 суток стадия острого воспаления развивалась до пролиферативной. Дефект замещался грануляционной тканью, представленной плотными пучками коллагеновых волокон, инфильтрированными макрофагами, фибробластическими и иммунными клетками.

Среди клеток соединительной ткани преобладали клетки фибробластического ряда: мезенхимные клетки, юные фибробласты и зрелые фибробласты с активной коллагенсинтетической (коллагенобласты II типа) деятельностью (рис. 1).

На 21 сутки в месте дефекта выявлялись признаки трансформации грануляционной ткани в жировую. На фоне разрастания волокнистой соединительной ткани выявлялись как единичные жировые капли, так и их скопления (рис. 2).

В цитоплазме фибробластов помимо характерной хорошо развитой саркоплазматической сети наблюдались разнокалиберные липидные капли, которые накапливались и заполняли весь объем цитоплазмы, смещая ядро на периферию клетки (рис. 3). В патологической зоне в условия гипоксии и воспаления известна способность трансформации фибробластических клеток в адипоциты [1; 5].

Спустя 30 суток в результате заживления формировался неадекватный регенерат, состоящий из жировой и плотной волокнистой соединительной тканей. Данный исход был обусловлен активацией

деятельности клеток фибробластического дифферона с усиленной коллагенпродуцирующей активностью.

В опытной группе после имплантации АГБ в начальные сроки 3–7 суток в паратравматической зоне обнаруживались признаки острого воспаления, обусловленные механическими воздействиями, возникшими вследствие оперативного вмешательства. В центральной области трансплантата выявлялась сеть фибриновых волокон на фоне экссудативного пропитывания. Через 7–14 суток фаза острого воспаления менялась на пролиферативную. Рыхлая сеть коллагеновых волокон, инфильтрированная макрофагальными и фибробластическими клетками разрасталась центростремительно – от периферии к центру. Фибробласты содержали суженные каналы ГЭР и классифицировались как коллагенобласты I типа – клетки с умеренным синтезом коллагена (рис. 4).

Через 14 суток АГБ подвергался постепенной биодеградации и резорбции фагоцитарными макрофагами, доля которых доминировала среди соединительнотканых клеток [8]. В зоне трансплантации формировался мышечно-соединительнотканый регенерат с преобладанием васкуляризированной рыхлой неоформленной волокнистой соединительной ткани. Наряду со стромальными клетками обнаруживались миогенные клетки, образующие почки роста и тяжи новообразованных тонких мышечных волокон, ориентированных вдоль вектора нагрузки, т.е. параллельно каналам предсуществующего АГБ (рис. 5).

Через 30 суток в очаге трансплантации обнаруживался мышечно-соединительнотканый регенерат с преобладанием мышечной ткани. А через 60–90 суток зона дефекта замещалась полноценной мышечной тканью, где пучки мышечных волокон были окутаны эндо- и перимизием (рис. 6).

Неравнозначный механизм заживления скелетной мышечной ткани в контрольной и опытной группах может быть обусловлен определенной цитокиновой нагрузкой клеток гистиона. Цитокин TGF- $\beta 1$ оказывает противовоспалительный эффект и является промотором фиброза и иммуносупрессором – блокирует активацию лимфоцитов и макрофагов [14].

Его повышенное содержание в мышечной ткани приводит к ее дисрегенерации и атрофии [13]. При исследовании динамики клеток, секретирующих TGF- $\beta 1$, влияние фактора «наличия/отсутствия» АГБ в этом случае оказалось ничтожным, хотя и значимым ($\eta^2=2\%$, $F=6,3$, $p<0,02$). Наиболее сильное воздействие на количество данных клеток оказывал фактор времени – $\eta^2=40\%$, $F=26$, $p<<0,0001$ (табл. 1).

Через 3 суток количество TGF- $\beta 1^+$ -клеток в контрольной группе почти в 9 раз превышало численность таковых в опытной – $17,2\pm 6,6$ против $2\pm 1,5$. В контроле число клеток достигало максимума (в среднем $26,4\pm 13,8$) на 7 день и соответствовало накоплению фибробластических клеток в регенерате. А после имплантации АГБ пиковые значения TGF- $\beta 1^+$ -клеток наблюдались лишь через 14 суток ($14,4\pm 4,9$), что в 1,8 раз меньше. Это могло способствовать задержке пролиферативной стадии воспаления и препятствовать накоплению коллагена в реактивной зоне. К данному сроку число клеток в контрольной группе значимо снижалось до $18,5\pm 7,4$ ($p<0,02$) и к 30 суткам резко падало до «следовых» значений ($1,6\pm 1,3$), а через два месяца они не встречались вовсе.

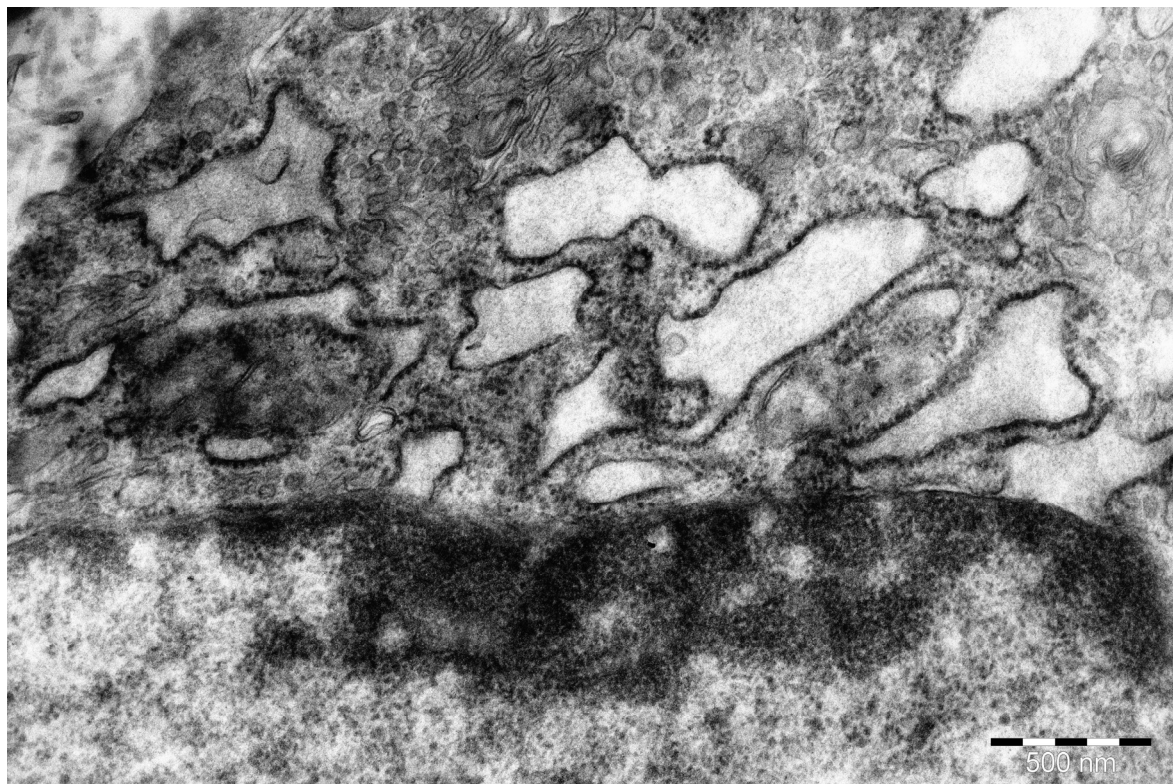


Рис. 1. Коллагенобласт II типа с резко расширенными каналами ГЭР через 14 суток после нанесения дефекта в скелетной мышечной ткани. Электронограмма. Увеличение $\times 10\,000$.

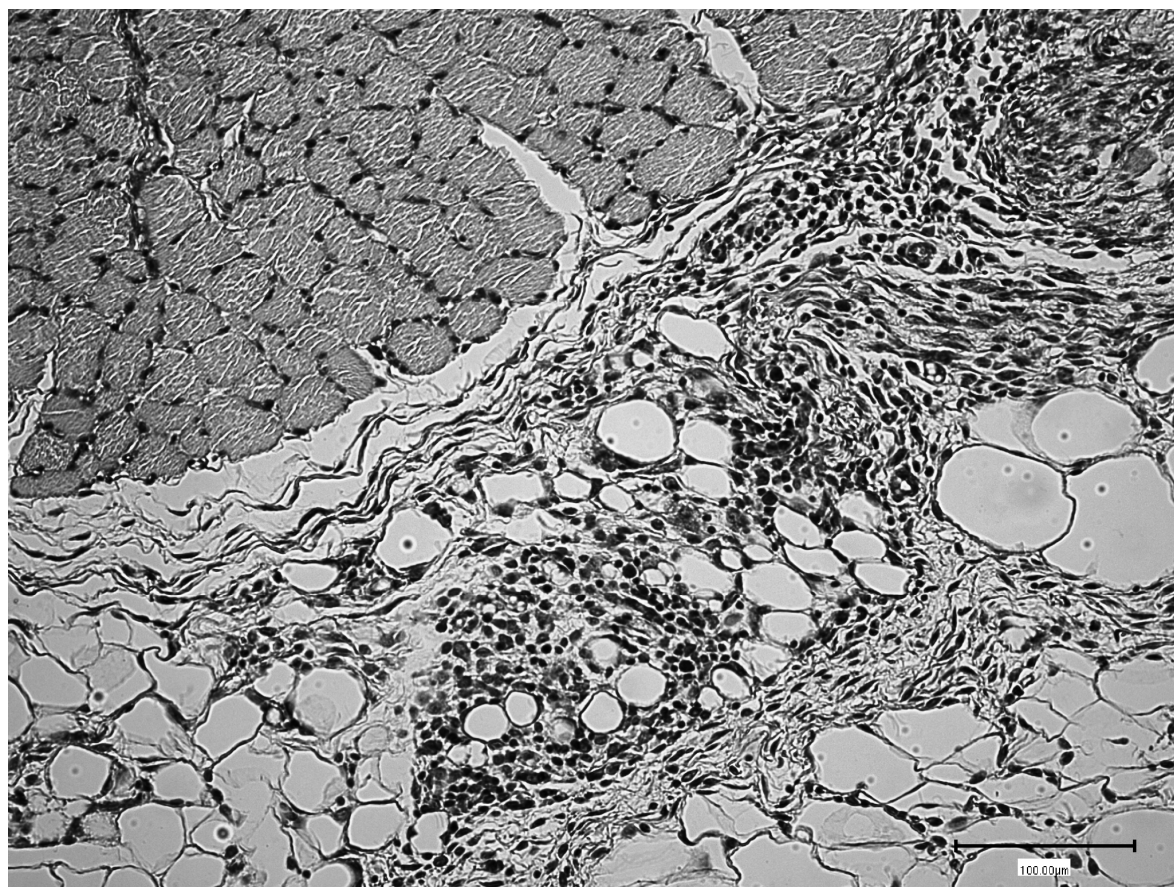


Рис. 2. Формирование соединительнотканного регенерата с трансформацией в жировую ткань через 21 сутки после нанесения дефекта в скелетной мышечной ткани. Окраска гематоксилином и эозином.

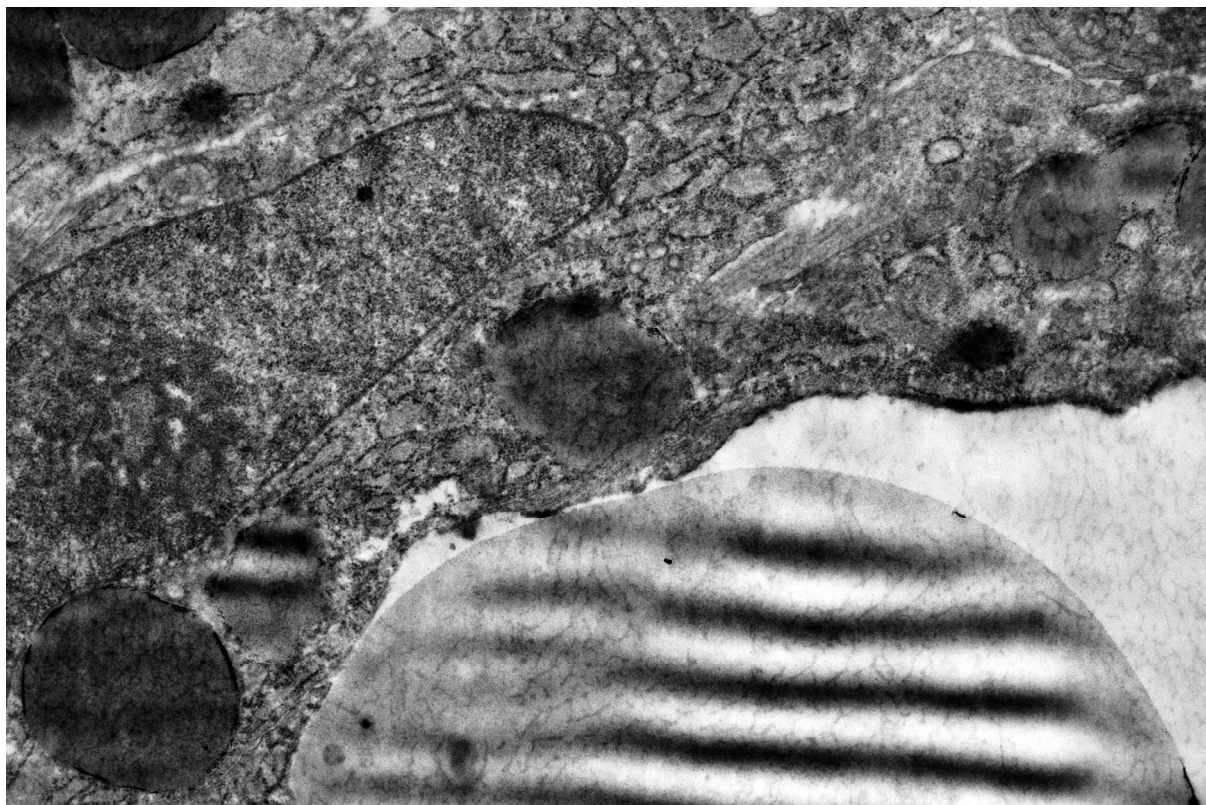


Рис. 3. Преадипоцитарный фибробласт через 21 сутки после нанесения дефекта в скелетной мышечной ткани. Электронограмма. Увеличение $\times 6\,000$.

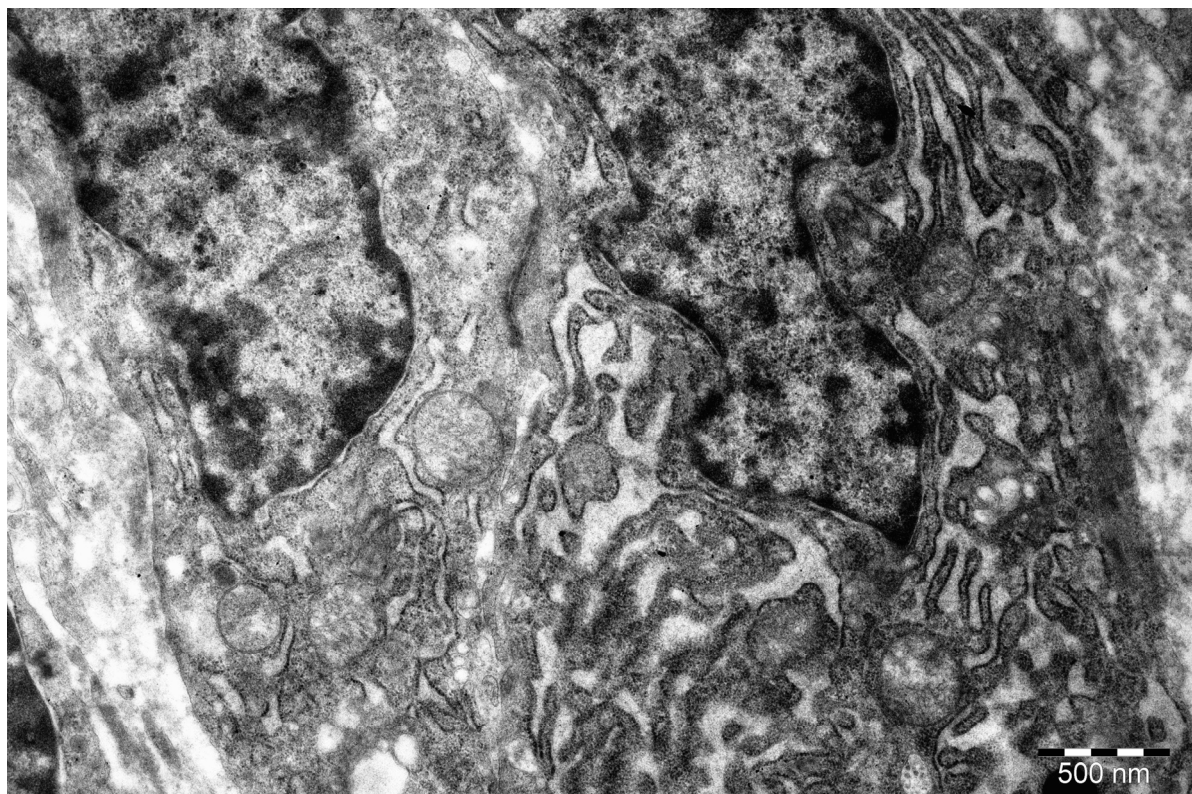


Рис. 4. Юный фибробласт в контакте со зрелым коллагенобластом I типа через 7 суток после имплантации АГБ. Электронограмма. Увеличение $\times 4\,000$.

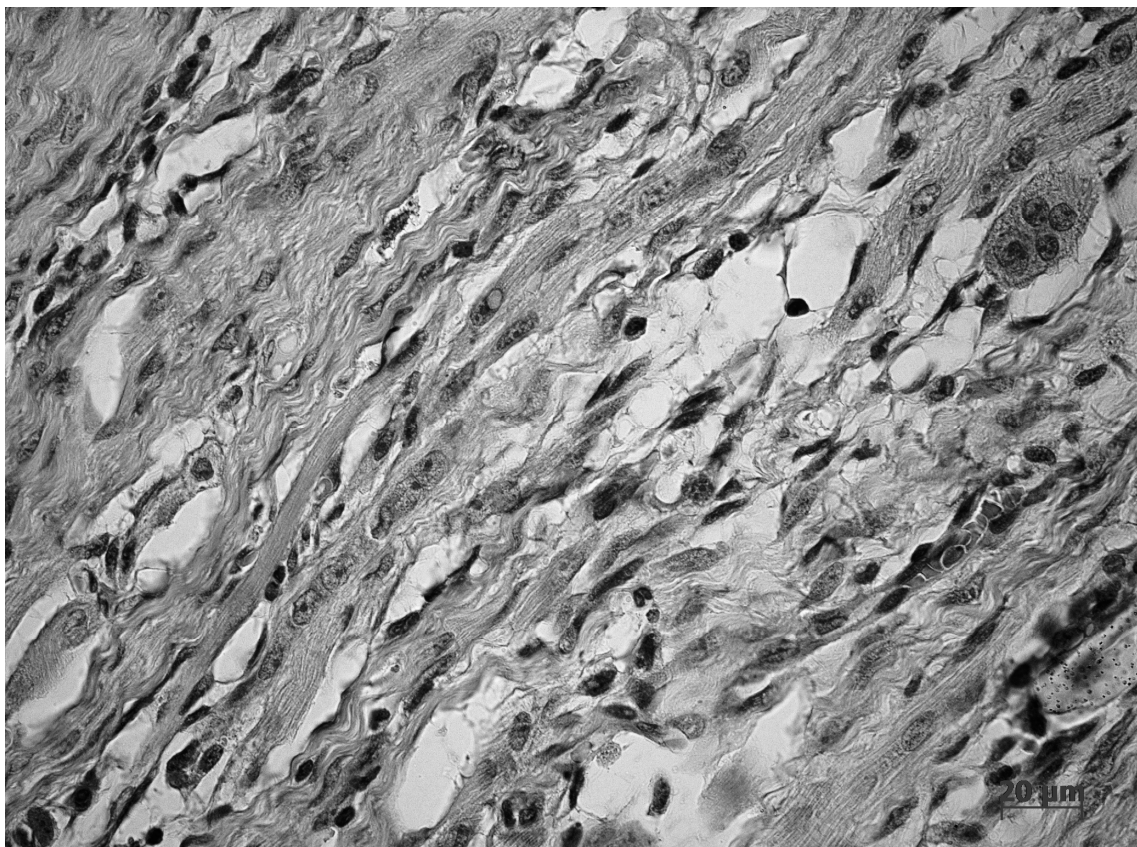


Рис. 5. Новообразованный соединительнотканно-мышечный регенерат с преобладанием соединительнотканного компонента в периферической зоне через 14 суток после имплантации АГБ. Окраска гематоксилином и эозином.

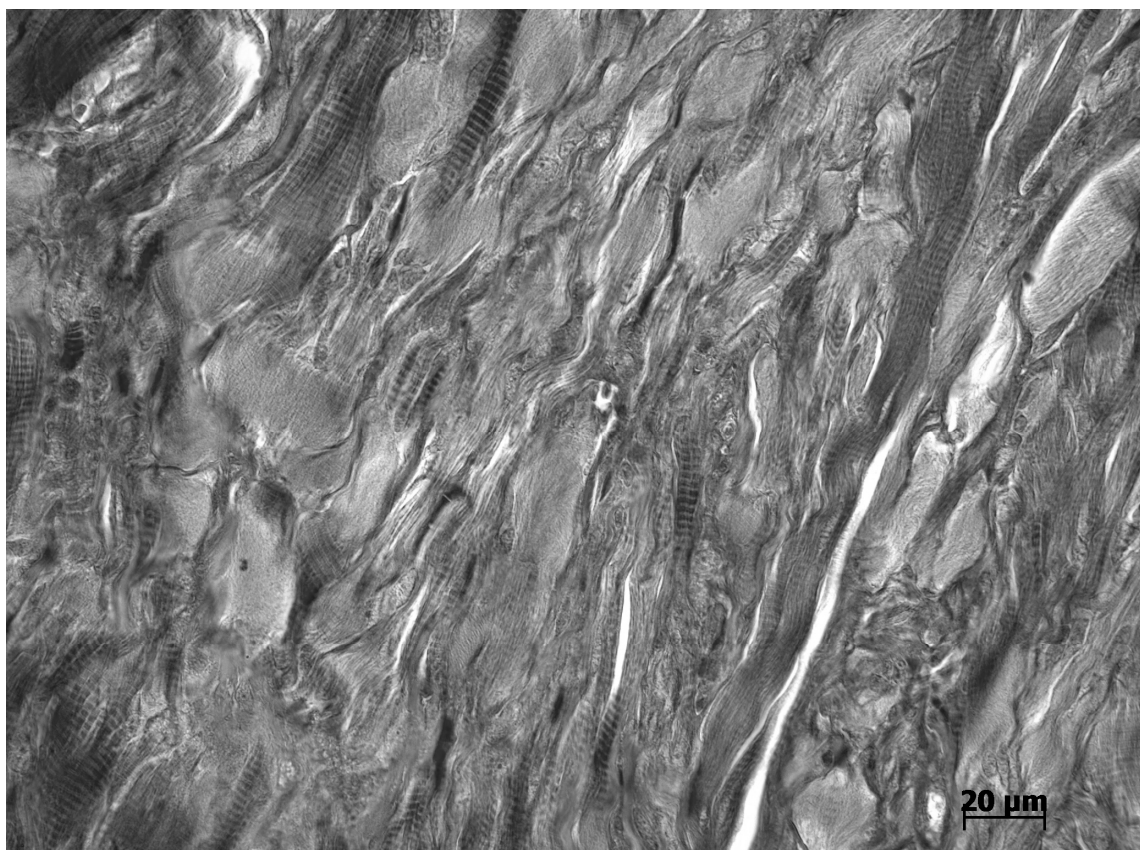


Рис. 6. Новообразованная мышечная ткань в зоне трансплантации АГБ спустя 30 суток. Окраска по Маллори.

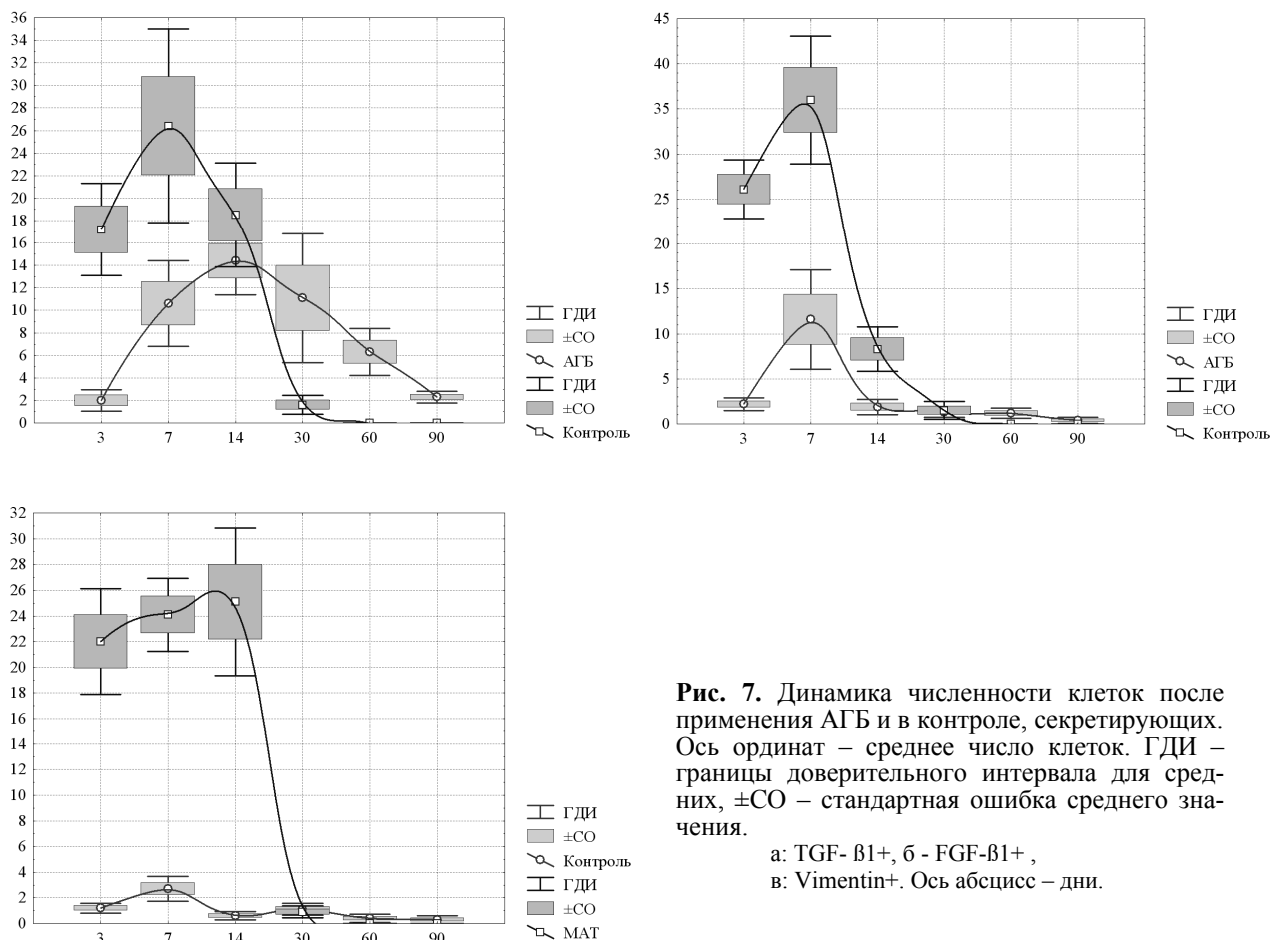


Рис. 7. Динамика численности клеток после применения АГБ и в контроле, секретирующих. Ось ординат – среднее число клеток. ГДИ – границы доверительного интервала для средних, ±СО – стандартная ошибка среднего значения.

а: TGF-β1+, б - FGF-β1+,
в: Vimentin+. Ось абсцисс – дни.

Таблица 1

Изменение количества TGF-β1+ клеток в опытной и контрольной группах

TGF-β1	3 суток	7 суток	14 суток	30 суток	2 мес	3 мес
АГБ	2±1,5	10,5±6,1	14,4±4,9	11,1±9,2	6,3±3,3	2,3±0,8
Контроль	17,2±6,6	26,4±13,8	18,5±7,4	1,6±1,3	0	0

Таблица 2

Изменение количества FGF-β1+ клеток в опытной и контрольной группах

FGF-β1	3 суток	7 суток	14 суток	30 суток	2 мес	3 мес
АГБ	2,2±1,1	11,6±8,9	1,9±1,3	1,3±0,9	1,2±0,9	0,4±0,5
Контроль	26,1±5,2	36±11,4	8,3±4,0	1,5±1,5	0	0

Таблица 3

Изменение количества vimentin + клеток в опытной и контрольной группах

vimentin	3 суток	7 суток	14 суток	30 суток	2 мес	3 мес
АГБ	1,2±0,6	2,7±1,5	0,6±0,5	1,1±0,7	0,4±0,5	0,3±0,4
Контроль	22±6,6	24,1±4,5	25,1±9,2	0,9±0,7	0	0

После применения АГБ снижение численности TGF-β1+–клеток наблюдалось в период 30–90 суток и носило пролонгированный (2,3±0,8) характер (критерий Краскела-Уоллеса в опыте $\chi^2=33$, $p<<0,0001$, в контроле $\chi^2=13,6$, $p<0,004$ (рис. 7, А)). Подобная динамика способствовала увеличению длительности регенерационного периода, что вероятно содействует индукции всех элементов мышечной ткани.

FGF-β1 известен как мощный стимулятор ангиогенеза, пролиферации и роста фибробластов, отвечающих за секрецию экстраклеточного матрикса [11]. Численность FGF-β1+–клеток в период 0–30 суток зависела как от фактора наличия/отсутствия (контроль) АГБ ($\eta^2=26\%$; $F=115,8$,

$p<<0,0001$), так и от сроков наблюдения ($\eta^2=42\%$, $F=61,5$, $p<<0,0001$). Достаточно выраженным оказалось сочетанное влияние обоих факторов ($\eta^2=16\%$, $F=23,2$, $p<<0,0001$). Различие значений в опыте и в контроле состояло не в динамике изменения количества FGF-β1+–клеток во времени, а в уровне этих изменений (табл. 2). Через 3 суток после начала эксперимента количество FGF-β1+–клеток после имплантации АГБ и в контроле составляло 2,2±1,1 и 26,1±5,2 соответственно, т.е. различалось практически на порядок. На седьмой день число клеток параллельно друг другу увеличилось, но различие между обеими группами продолжало оставаться трехкратным (11,6±8,9 и 36±11,4 соответственно).

На 14 день среднее число FGF- $\beta 1^+$ -клеток в опытной группе снижалось до первоначального уровня и выходило на «фазу плато» ($1,9 \pm 1,3$), а в контроле оказалось ниже исходного уровня ($8,3 \pm 4,0$) в три раза, но по-прежнему оставалось многократно выше, чем после применения АГБ. Однако через 1 месяц после начала эксперимента численность FGF- $\beta 1^+$ -клеток в опыте и контроле не снижалась, а выравнивалась, составив соответственно $1,3 \pm 0,9$ и $1,5 \pm 1,5$ (U-критерий: $Z=0,04$, $p>0,96$). Критерий Краскела-Уоллеса был высоко значим: опыт – $\chi^2=36,8$, $p<<0,0001$, контроль – $\chi^2=33,7$, $p<<0,0001$ (рис. 7, Б). Высокая концентрация FGF- $\beta 1^+$ клеток в контрольной группе обуславливает развитие гранулематозной ткани с доминированием в гистионе фибробластоподобных клеток, особенно в период 7 суток.

За усиление междифференциальной гетероморфии тканевых элементов в реактивной зоне мышечного регенерата и экспрессию профиброгенных факторов могут отвечать Vimentin $^{1+}$ клетки [9]. При исследовании численности Vimentin $^+$ -клеток фактор «наличия/отсутствия» АГБ оказывал менее выраженное влияние ($\eta^2=27\%$, $F=278$, $p<<0,0001$). Более существенным было влияние фактора времени и сочетанное действие обоих факторов: $\eta^2=34\%$, $F=69$, $p<<0,0001$ и $\eta^2=29\%$, $F=59$, $p<<0,0001$ соответственно. Количество Vimentin $^+$ -клеток в контроле значительно превышало таковое в опытной группе в период 0–14 суток и соответствовало развитию провизорной недифференцированной гранулематозной ткани с наличием обильной сосудистой сети и малодифференцированных мезенхимных и зрелых фибробластических клеток (табл. 3). К 30 суткам число таких клеток в контрольных препаратах резко снижалось с практически стабильных $22 \pm 6,6$; $24,1 \pm 4,5$ и $25,1 \pm 9,2$ на 3-й, 7-й и 14-й день наблюдений до «следового» уровня $0,9 \pm 0,7$ и фактически совпадало с таковым в опытных препаратах в тот же срок – $1,1 \pm 0,7$.

Резкое снижение массы клеточных элементов может быть обусловлено накоплением стромальных элементов – коллагена и жирового перерождения. Через 60–90 дней в контрольной группе Vimentin $^+$ -клетки не обнаруживались (критерий Краскела-Уоллеса – $\chi^2=60$, $p<<0,0001$). После имплантации АГБ Vimentin $^+$ -клетки выявлялись в следовых количествах: через 3 суток – $1 \pm 0,5$; 7 суток – $3 \pm 1,5$ ($p<0,002$); 14–90 суток – $0,5 \pm 0,5 \div 1 \pm 0,5$. Критерий Краскела-Уоллеса показал высокую значимость результатов – $\chi^2=22$, $p<0,0005$ (рис. 7, В).

Слабое проявление мезенхимной реакции может служить признаком зрелости регенерата. Но ее длительность значительно превосходила контрольную группу, что могло вызвать развитие рыхлой соединительной ткани на всем протяжении замещения АГБ.

Литература

1. Бозо И. Я., Деев Р. В., Пинаев Г. П. "Фибробласт" – специализированная клетка или функциональное состояние клеток мезенхимного происхождения? // Цитология. – 2010. – Т. 2, № 52. – С. 99–109.
2. Булякова Н.В., Азарова В.С. Морфофункциональные особенности тимуса и мышечных регенератов при воздействии лазерного излучения и аллопластики мышечной ткани взрослого животного в области мышечной травмы // Известия РАН. Серия биологическая. – 2009. – № 1. – С. 18–26.
3. Данилов Р.К. Раневой процесс: гистогенетические основы. СПб: ВМедА им. С.М. Кирова, 2008. – 308 с.

¹Vimentin – белок промежуточных филаментов мезенхимных клеток соединительной ткани, к которым относятся клетки фибробластического дифферона, эндотелиоциты.

Проведенные исследования показывают, что в контрольной группе в пролиферативной фазе воспаления наиболее активной является фибробластическая деятельность. Выраженная экспрессия FGF- $\beta 1^+$ -клеток и TGF- β^+ -клеток в ранней стадии заживления сопровождалась усиленной миграцией мезенхимных клеток и поддержке их дифференциации в фибробластические клетки – коллагенобласты II типа. Данные аспекты способствовали интенсивному синтезу коллагеновых волокон и стремительному фиброзированию мышечного дефекта с последующим перерождением в жировую ткань за счет трансформации фибробластов в адипоциты.

Установлено, что *in vitro* экстракты биоматериала "Аллоплант" являются ингибитором клеточной пролиферации, в частности – фибробластов [10]. А *in vivo* происходит дозированная экстракция гиалуроновой кислоты и сульфатированных ГАГ-ов (дерматан- и кератансульфатов) из АГБ, которые играют структурно-информативную роль для фибробластов через посредничество макрофагов и регулируют паренхиматозно-стромальные взаимоотношения [7]. После применения АГБ в регенерате определялось низкое/умеренное содержание FGF- $\beta 1^+$ -клеток и TGF- β^+ -клеток, чему способствовал дефицит Vimentin $^+$ -клеток. Таким образом, для полноценной регенерации скелетной мышечной ткани актуально не только стимулирование резервного пула миопрогениторных клеток, а подавление профиброгенных факторов, способствующих избыточному коллагеногенезу. Следовательно, продукты резорбции трансплантата создают микроокружение, которое оказывает селективное воздействие на миграцию и пролиферацию фибробластических клеток и индуцирует резервный пул миопрогениторных клеток.

Выводы

1. При заживлении глубоких повреждений скелетной мышечной ткани выявляется выраженная экспрессия профиброгенных цитокинов FGF- $\beta 1^+$ и TGF- β^+ , которая способствует стремительному синтезу коллагеновых волокон и замещению дефекта рубцом с последующей трансформацией его в жировую ткань. Рост и поддержка незрелого регенерата осуществляется за счет Vimentin $^+$ -клеток.
2. После применения АГБ исходом заживления является восстановление скелетной мышечной ткани. Продукты резорбции служат супрессором факторов фиброза в скелетной мышечной ткани – FGF- $\beta 1^+$, TGF- β^+ и Vimentin $^+$ -клеток, тем самым, индуцируя развитие всех элементов мышечной ткани.

4. Зорин В.Л., Черкасов В.Р., Зорина А.И., Деев Р.В. Характеристика мирового рынка клеточных технологий // КТТИ. – 2010. – № 3. – С. 96–115.
5. Киселева Е. В., Чермных Э. С, Воротеляк Е. А. и др. Сравнение дифференцировочных потенций фибробластоподобных клеток стромы костного мозга, жировой ткани, волосяного сосочка и фибробластов дермы человека // Цитология. – 2009. – Т. 1, № 51. – С. 12–9.
6. Лебедева А.И. Структурно-функциональная характеристика макрофагов, выявленных при имплантации биоматериалов (экспериментально-морфологическое исследование): Авторефер. дис... канд. биол. наук. – Уфа, 2004. – 23 с.
7. Лебедева А.И. Регуляция паренхиматозно-стромальных взаимоотношений при коррекции дефектов скелетной мышцы аллогенным биоматериалом // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. – 2014. – № 1. – С. 51–6.
8. Лебедева А.И., Муслимов С.А., Мусина Л.А., Гареев Е.М. Роль резидентных макрофагов в регенерации скелетной мышечной ткани, индуцированной биоматериалом Аллоплант // Биомедицина.. – 2014. – № 2. – С. 43–50.
9. Минин А.А., Молдавер М.В. Виментиновые промежуточные филаменты и их роль во внутриклеточном распределении органелл // Успехи биологической химии. – 2008. – Т. 48. – С. 221–5.
10. Мулдашев Э.Р., Уймен Т.Дж., Курчатова Н.Н. и др. Влияние экстракта трансплантата для пластики века серии Аллоплант на синтез ДНК в культуре клеток // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1994. – №1. – С. 75–9.
11. Пальцев М.А., Иванов А.А. Межклеточные взаимодействия. – М.: Медицина, 1995. – 224 с.
12. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
13. Burks T. N., Cohn R. D. Role of TGF- β signaling in inherited and acquired myopathies // Skeletal Muscle. – 2011. – P. 1–19.
14. Yoshimura A., Muto G. TGF- β function in immune suppression // Curr Top Microbiol Immunol. – 2011. – 350. – P. 127–147.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АГБ	– аллогенные губчатые биоматериалы
ГЭР	– гранулярный эндоплазматический ретикулум

УДК 616-006.484-085.2/3.099:578.826

И.В. Уласов¹, Н.В. Каверина², А.Ю. Барышников²**ИНФЕКЦИЯ КЛЕТОК ГЛИОМ ОНКОЛИТИЧЕСКИМ ВИРУСОМ
СЕНСИБИЛИРУЕТ ИХ К ТЕРАПИИ ТЕМОЗОЛОМИДОМ**¹Центр опухолей головного мозга, Шведский медицинский центр, Сиэтл, США²ФГБНУ «РОНЦ им Н.Н. Блохина», Москва**Контактная информация**

Уласов Илья Валентинович, к.б.н., ведущий сотрудник центра лечения опухолей головного мозга

адрес: 550 17th Avenue, suite 570, Seattle, Wa, 98122, USA; тел. +1-206-991-2053

e-mail: ulasov75@yahoo.com

Статья поступила 03.07.2014, принята к печати 24.11.2014.

Резюме

Опухолевые стволовые клетки являются объектами исследований и терапевтических интервенций. Недавно популяция клеток, обладающая характеристиками стволовых клеток, была идентифицирована в глиомах. Оказалось, что такие клетки экспрессируют поверхностный маркер проминин-1/ CD133, формируют сфероиды *in vitro* и отличаются высокой способностью к делению с превращением их в нейроны, астроциты или олигодендроциты. Активация генетических программ в опухолевых стволовых клетках контролирует не только их дифференциацию, но и высокую устойчивость к терапевтическим препаратам. В этой работе мы продемонстрировали, что глиомные стволовые клетки могут служить эффективными мишенями для онколитической терапии. Более того оказалось, что онколитическая аденовиротерапия в присутствии ингибиторов GLI-сигнального пути увеличивает эффективность применения темозоломида *ex vivo*.

Ключевые слова: глиома, аденовирус, темозоломид, токсичность.I.V. Ulasov¹, N.V. Kaverina², A.Yu. Baryshnikov²**INFECTION OF GLIOMAS WITH ONCOLYTIC ADENOVIRUS
SENSITIZED THEM TO TEMOZOLOMIDE**¹Advanced Brain Tumor Treatment, Swedish Medical Center, Seattle, Wa, USA²FSBSI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow**Abstract**

Cancer stem cells are represent one of the target for conventional therapy. Recently, stem cell-like subpopulations have been identified in human gliomas. These cells resemble neural stem cells since they express neural stem cell markers such as prominin-1/ CD133, are capable of self-renewal, form neurosphere-like spheroids, and differentiate into neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. Activation of genetic program insides these cells governs cells differentiation and their resistance to the therapeutic modalities. In our study we demonstrate that CD133 positive cancer stem cells exhibit perfect opportunity for the oncolytic therapy. Moreover, infection of glioma stem cells in the presence of SHH inhibitor has a beneficial effect for temozolomide application *ex vivo*.

Key words: glioma, adenovirus, temozolomide, toxicity.**Введение**

Мультиформная глиобластома – наиболее распространенная и агрессивная форма первичной опухоли головного мозга [1–3]. Несмотря на агрессивные терапевтические подходы, включая лечение темозоломидом, выживаемость пациентов не превышает 24 мес. Одна из причин низкой продолжительности жизни этой группы пациентов может быть связана с нечувствительностью опухолевых клеток к терапии и высоким уровнем их резистентности, что является большой клинической проблемой в нейроонкологии.

Мультиформная глиобластома является высоко гетерогенной опухолью, состоящей из популяции клеток, обладающих различным потенциалом к росту и чувствительности к терапии [4; 9; 10]. Известно, что проминин (CD133) – маркер мезенхимальных CD34⁺ клеток, представлен на поверхности стволовых клеток глиом, резистентных к терапии [11]. Показано, что в данных клетках генетические изменения затрагивают WNT-, NOTCH- и GLI- сигнальные пути, которые необходимы клеткам для поддержания жизнедеятельности.

Давно известно, что вирусы способны селективно убивать клетки опухоли, однако в последние годы появилась возможность получения вариантов вирусов, обладающих максимальным терапевтическим потенциалом. Онколитические аденовирусы разрабатываются для направленного уничтожения злокачественных клеток. Используя различные модели опухоли, было показано, что высокая экспрессия вирусных белков аденовирусной области E1A вызывала гибель, зараженных, чувствительных к ним раковых клеток. Недавно нашей группой было отмечено, что высокая специфичность аденовируса может быть увеличена за счет использования специфичного промотора и/или путем клонирования рецептор-связывающих доменов в структурные белки аденовируса [8; 13]. Поскольку ингибирование роста глиом связано с аттенуацией роста опухолевых стволовых клеток, мы изучили возможность направленной доставки вирусных белков в CD133⁺ клетки в присутствии химического ингибитора GLI-сигнального пути и темозоломида. Мы предполагаем, что комбинирование онколитической терапии с ингибированием GLI-сигнального пути ограничит пролиферацию CD133⁺ клеток и усилит терапевтический эффект темозоломида.

Материалы и методы

Клеточные культуры

Линия глиом человека U251MG была получена в Американской коллекции клеточных линий (ATCC, США). Клетки были культивированы в среде MEM (HyClone, США), содержащей 10 %-ную ТЭС, 1 %-ную смесь пенициллина и стрептомицина (Invitrogen, США). Первичные клетки глиобластом были получены от пациентов с диагнозом “глиома IV степени злокачественности в процессе оперативного вмешательства”. Все процедуры были проведены в отделении нейроонкологии Institutional Review Board Российского Онкологического Центра. Культура CD133⁺ и CD133⁻ клеток была культивирована в среде Neurobasal A, содержащей 20 нг/мл FGF, 20 нг/мл of EGF, N2 и B27 супплемент (Invitrogen, США) [7].

Иммунофлуоресцентный анализ и сортинг

CD133⁺-клетки, полученные в результате сортирования, были проинкубированы с 1 мкг одного из следующих первичных антител: CD80 (BD Pharmingen, США), CD86 (Chemicon, США), CAR (Abcam, США), CD46 (BD Pharmingen, США), $\alpha_v\beta_3$ (Chemicon, США), или $\alpha_v\beta_5$ (Chemicon, США) в течение 30 минут при 4 °C. На следующем этапе данные клетки промывали 3-кратно по 5 минут в 0,01M фосфатном буфере (pH 7,6) и инкубировали с 1 мкг вторичных антител (BD Pharmingen, США). Изотипический контроль был использован для определения неспецифического связывания для каждого антитела. Подсчет клеток производили на анализаторе FACSCanto (Becton&Dickinson, США). В каждом образце были проанализированы минимум 10000 клеток.

Вирусы и химиопрепараты

Репликативно-дефектные AdWT-Luc, AdRGD-Luc, AdCAV1-Luc, AdCAV2-Luc и Ad5/3-Luc вектора, содержащие ген люциферазы под контролем CMV-промотора, были описаны ранее [5; 12]. Постоянно реплицирующиеся векторы, содержащие промотор гена сюрвивина человека, а также белок фибера “дикого” типа или модификации RGD, pk7, 5/3 были получены нами, используя AdEasy протокол [6]. Титр вирусов был определен по протоколу производителя (Adeno Titer X kit, Clontech, США).

Анализ люциферазной активности

Люциферазная активность была измерена путем добавления 20 мкл люциферазного субстрата (Promega, США) к 50 мкл лизированных клеток и затем измерена на люцинометре (Turner Biosystems, США). Результаты были стандартизированы, используя Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, США).

Инфекция клеток аденовирусным вектором

CD133⁺ и CD133⁻ клетки в количестве 1×10^3 через 24 ч после начала эксперимента были инфицированы в дозе 100 частиц на клетку. Час спустя не адсорбированный на клетках вирус был удален, клетки промыты фосфатным буфером, и к клеткам добавлена среда с ростовыми факторами. Через 1; 3; 5 или 7 дней после инфекции клетки были проанализированы в реакции количественных транскрипции и репликации, клеточной токсичности (LDH, Promega, США) или титровании вируса.

Статическую значимость результатов оценивали с помощью критерия Стьюдента. Разни-

цу между величинами, соответствующую $p < 0,05$, принимали как достоверную.

Результаты и обсуждение

Для определения чувствительности стволовых клеток глиом к аденовирусной инфекции мы изучили экспрессию аденовирусных рецепторов на поверхности клеток-мишеней.

Для этого мы выделили CD133⁺-клетки из общей популяции клеток глиом. В наших экспериментах уровень CD133⁺-клеток варьировал в пределах 0,2–26,8 % от общего количества клеток, однако при использовании APC-меченных антител процент CD133⁺-клеток в выделенной популяции вырос до 60–70 %. Выделенные клетки были проанализированы в реакции проточной цитофлуориметрии с использованием антител к аденовирусным рецепторам (рис. 1, табл.).

Было показано, что CD133⁺-клетки содержали высокий уровень $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_v\beta_5$ интегринов, которые, как известно, являются маркерами активной инвазии и ангиогенеза глиом.

Оказалось, что интегрин $\alpha_v\beta_3$ был детектирован на поверхности 27,3 %; 64,1 % и 58,1 % клеток ГБМ1, ГБМ2 и U251, тогда как рецептор $\alpha_v\beta_5$ был обнаружен на поверхности клеток 11 % ГБМ1; 66,7 % ГБМ1 и 3,12 % U251.

На следующем этапе исследования мы инфицировали клетки CD133⁺ и CD133⁻ различными аденовирусами (AdWT-Luc, Ad5/3-Luc, AdRGD-Luc, AdCAV1-Luc AdCAV2-Luc), распознающие следующие рецепторы: CD46, CAR, CD80, CD86 и интегрины.

Мы обнаружили, что модификации вируса RGD и CAV2 обеспечивают наивысший уровень инфекции опухолевых CD133⁺ клеток глиом (в 1,7–2 увеличенная инфекционность vs ADWT). Похожие результаты были получены при инфекции CD133⁺ U251-перевиваемых клеток.

Поскольку CD133⁺-клетки (ГБМ1 и U251) содержат на своей поверхности большое количество рецепторов $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_v\beta_5$, можно предположить наличие корреляции между активностью AdRGD-Luc вектора и высоким уровнем рецептора $\alpha_v\beta_3$.

Как показывают данные предыдущих исследований, клонирование промотора увеличивает специфичность аденовирусных векторов.

В этой связи мы изучили экспрессию потенциальных промоторов, чья экспрессия увеличена в CD133⁺-клетках.

По данным экспериментального анализа шести клинических образцов сурвивина обеспечивает наивысший уровень транскрипции среди изученных потенциальных кандидатов (рис. 2).

Таким образом, можно предположить, что клонирование промотора сурвивина в состав вирусного генома позволит увеличить инфекционность и специфичность рекомбинантных аденовирусных векторов к CD133⁺-клеткам. С этой целью нами была сконструирована панель онколитических векторов, чья токсичность изучена далее в реакции LDH.

Как представлено на рис. 3, наибольшая токсичность была обнаружена после инфекции SS-RGD вектора. От 40 до 70 % CD133⁺ клеток, выделенных из двух ГБМ1 и ГБМ2 клинических образцов, были лизированы RGD-модифицированным вектором. Данная активность была в 1,5–4 раза больше по отношению контрольному вектору Had5RGD.

Таблица

Фенотипические характеристики выделенных CD133⁺-стволовых клеток глиом

Рецептор	Case/CD133 ⁺		
	GBM, grade 4		H. Glioma cell
	GBM1	GBM2	U373MG
CD80	0	20,5	1,82
CD86	2,85	55,6	14,9
CAR	35,3	0	6,9
CD46	22,5	61,5	18,2
αvβ3	27,3	64,1	58,1
αvβ5	11,0	66,7	3,12

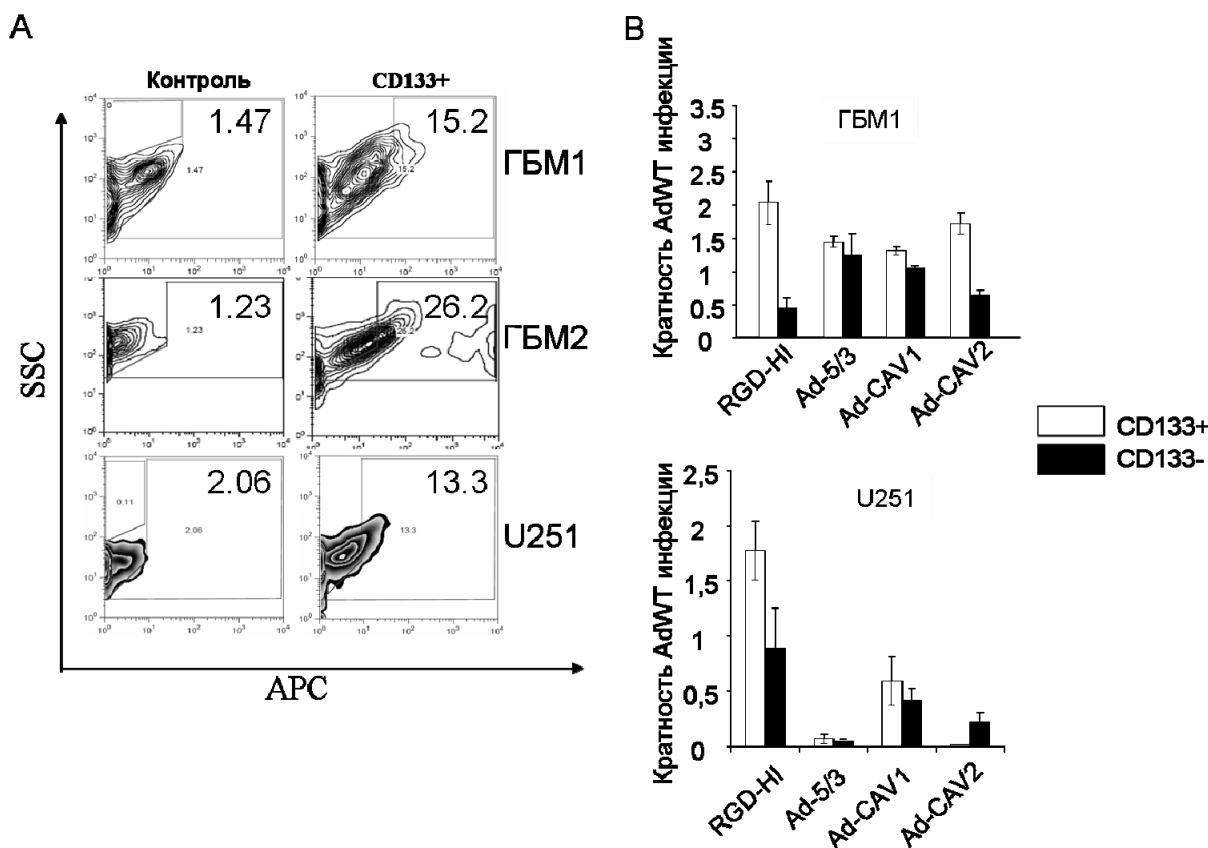


Рис. 1. Экспрессия интегринов на поверхности CD133 позитивных клеток обеспечивает высокий уровень инфекции стволовых клеток глиом:

- Определение экспрессии CD133 в клетках первичных глиом с помощью метода проточной цитофлуориметрии;
- Эффективность инфекции CD133⁺ стволовых клеток глиом аденовирусными векторами. Через 48 часов после инфекции CD133⁺ клетки были проанализированы на люциферазную экспрессию. Результаты представлены как уровень экспрессии люциферазы по отношению к контрольному вектору AdWT-luc (AdWT).

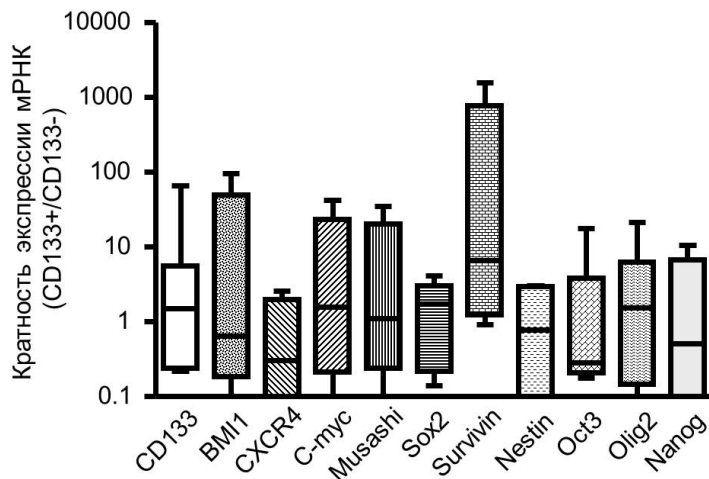


Рис. 2. Транскрипционный анализ экспрессии генов в CD133 позитивных клетках глиом с помощью количественного ПЦР. Активность CXCR4, Survivin, C-myc, BMI1, Sox2, Olig2, Nanog, Nestin, Mushashi, CD133, OCT4, как будущих промоторов для аденовирусного генного трансфера. В исследовании использовано 7 клинических образцов.

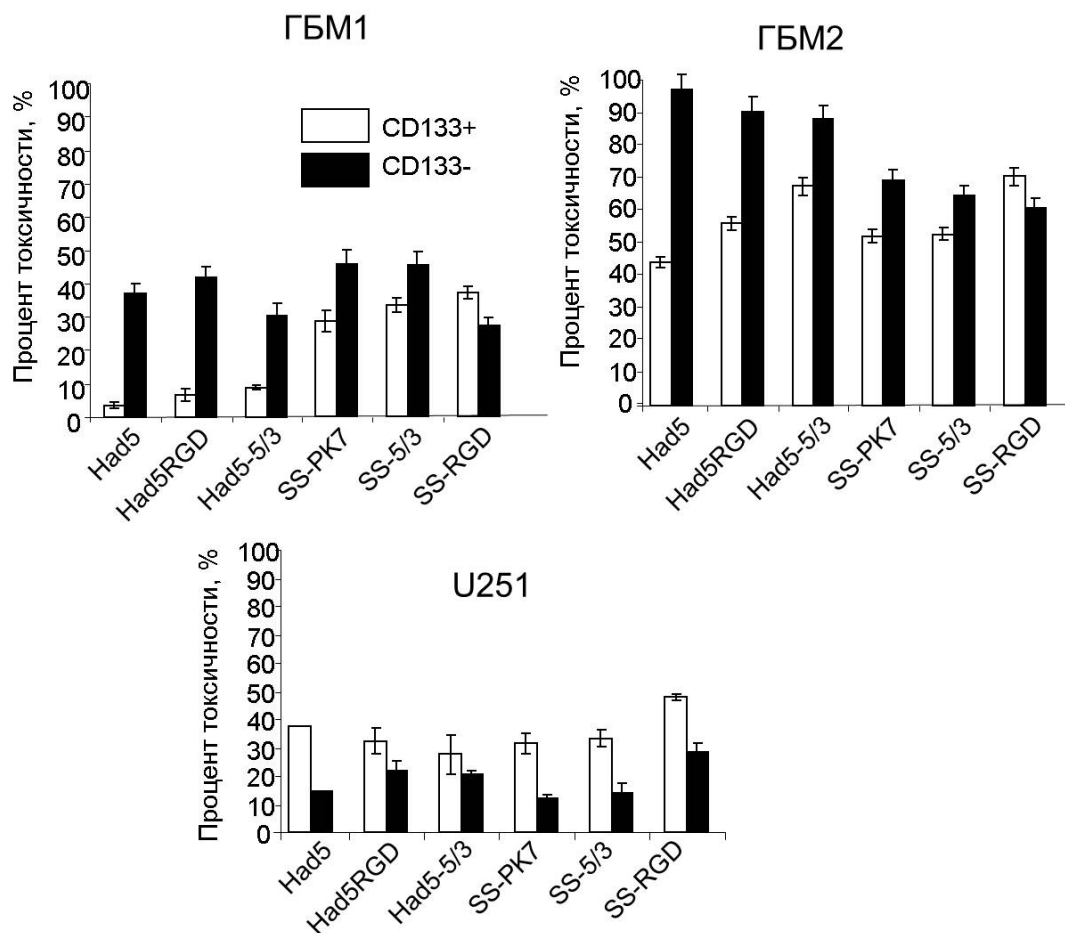


Рис. 3. CD133⁺-клетки чувствительны к инфекции онколитическим вирусом в CD133⁺ или CD133⁻ клетках была определена с помощью количественного ПЦР и LDH анализа.

- Вирусная репликация
- клеточная токсичность

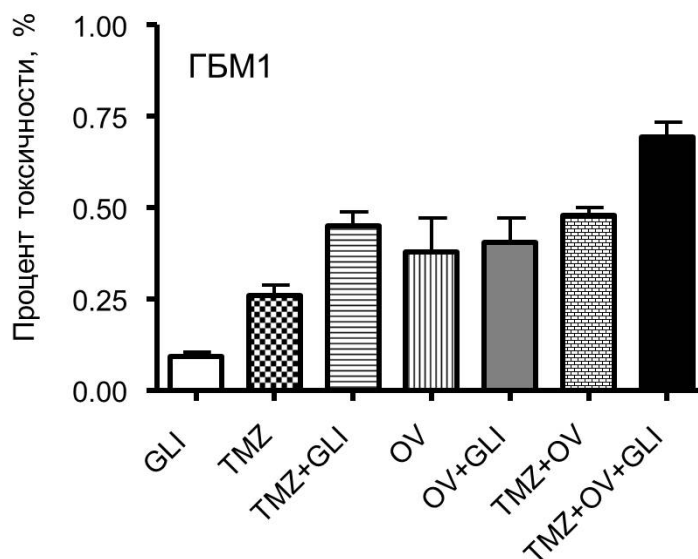


Рис. 4. Инфекция клеток глиом в присутствии ингибитора SHH повышает чувствительность CD133⁺ к темозоломиду. CD133⁺-клетки были инфицированы вирусом CRAAd-S-RGD в присутствии/отсутствии смеси SHH ингибитора/темозоломида и последующая токсичность определена в течение 3 дней. Среднее значение \pm стандартное значение (SD), представлены на основании 5 повторов, $p < 0,05$

Ранее мы показали, что инфекция аденовирусом оказывает аддитивный противоопухолевый эффект на активность темозоломида. Поскольку существуют данные, показывающие, что ингибирование GLI-сигнального пути увеличивает антиглиомную активность темозоломида, мы предполагаем, что комбинация онколитического вируса с ингибитором GLI способна еще больше усилить терапевтический эффект темозоломида. В наших экспериментах показано, что обработка CD133⁺-клеток с вирусом SS-RGD в присутствии ингибитора GLI увеличивала токсичность темозоломида ($0,48 \pm 0,03$ до $0,69 \pm 0,07$; рис. 4).

Литература

1. Брюховецкий И.С., Брюховецкий А.С., Мищенко П.В., Хотимченко Ю.С. Роль системных механизмов миграции и хоуминга стволовых клеток в развитии злокачественных опухолей центральной нервной системы и разработка новых методов противоопухолевой терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 3–12.
2. Уласов И.В., Каверина Н.В., Кадагидзе З.Г., Барышников А.Ю. Антиглиомная аденовирусная виротерапия: механизм, регуляция и клинические перспективы // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 11–8.
3. Уласов И.В., Каверина Н.В., Барышников А.Ю. Роль сурвивина в диагностике и терапии опухолей головного мозга // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 71–6.
4. Bao S., Wu Q., McLendon R.E. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response // Nature. – 2006. – 444(7120). – P. 756–60.
5. Borovjagin A.V., Krendelchtchikov A., Ramesh N. Complex mosaicism is a novel approach to infectivity enhancement of adenovirus type 5-based vector // Cancer Gene Ther. – 2005. – 12(5). – P. 475–86.
6. He T.C., Zhou S., da Costa L.T. A simplified system for generating recombinant adenoviruses // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1998. – 95(5). – P. 2509–14.
7. Lee J., Kotliarova S., Kotliarov Y. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines // Cancer Cell. – 2006. – 9(5). – P. 391–403.
8. Mei Y.F., Segerman A., Lindman K. Human hematopoietic (CD34+) stem cells possess high-affinity receptors for adenovirus type 11p // Virology. – 2004. – 328(2). – P. 198–207.
9. Salmaggi A., Boiardi A., Gelati M. Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype // Glia. – 2006. – 54(8). – P. 850–60.
10. Singh S.K., Clarke I.D., Terasaki M. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors // Cancer Res. – 2003. – 63(18). – P. 5821–8.
11. Stupp R., Hegi M.E. Targeting brain-tumor stem cells // Nat Biotechnol. – 2007. – 25(2). – P. 193–4.
12. Takayama K., Reynolds P.N., Short J.J. A mosaic adenovirus possessing serotype Ad5 and serotype Ad3 knobs exhibits expanded tropism // Virology. – 2003. – 309(2). – P. 282–93.
13. Tuve S., Wang H., Ware C. A new group B adenovirus receptor is expressed at high levels on human stem and tumor cells // J Virol. – 2006. – 80(24). – P. 12109–20.

Токсичность вируса SS-RGD, GLI ингибитора и темозоломида по отдельности была значительно меньше.

Заключение

В результате нашего исследования показано, что возможную резистентность темозоломида можно преодолеть, используя онколитический агент в комбинации с GLI-ингибитором. Поскольку многие антиглиомные агенты проходят клинические испытания, их комбинация имеет большое практическое значение.

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

В.А. Мисюрин
X-ХРОМОСОМНЫЕ РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫЕ ГЕНЫ..... 3

И.В. Уласов, Н.В. Каверина, З.Г. Кадагидзе, А.Ю. Барышников
**АНТИГЛИОМНАЯ АДЕНОВИРУСНАЯ ВИРОТЕРАПИЯ:
 МЕХАНИЗМ, РЕГУЛЯЦИЯ И КЛИНИЧЕСКИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ**..... 11

М.Т. Зангиева, А.А. Матюшин, Д.В. Соколова, О.В. Хугаева, М.А. Барышникова, А.Ю. Барышников
**РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ
 ИММУНОЛИПОСОМАЛЬНЫХ КОНСТРУКЦИЙ IN VITRO**..... 19

А.В. Лазукин
**ФАКТОР ПРОЛИФЕРАЦИИ KI-67
 КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ПРОГНОЗА ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**..... 29

Л.Л. Николаева, Н.А. Оборотова, Е.В. Санарова, А.В. Ланцова, Н.Д. Бунытян
**ПРИЧИНЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ
 ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АНЕМИИ, ВЫЗВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ ПРЕПАРАТАМИ**..... 35

Г.Н. Апрышко
**РЕСУРСЫ ИНТЕРНЕТА В ИНФОРМАЦИОННОМ ОБЕСПЕЧЕНИИ ИССЛЕДОВАНИЙ
 ПО СОЗДАНИЮ НОВЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛЕКАРСТВ**..... 41

Н.С. Рукк, Г.Н. Апрышко, А.Ю. Скрябина
**ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ СОЗДАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛЕКАРСТВ
 НА ОСНОВЕ КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЭЛЕМЕНТОВ ШВ-ГРУППЫ**..... 47

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

И.В. Уласов, А. Тусон, А.Ю. Барышников
**БЕЛОК ФИБЕРА АДЕНОВИРУСА ЧЕЛОВЕКА
 ОБЕСПЕЧИВАЕТ СТАБИЛЬНОСТЬ ВИРУСНЫХ КАПСИДОВ**..... 51

И.Н. Михайлова, А.А. Молодых, Л.Ф. Морозова, Н.В. Голубцова, А.Е. Бармашов, М.А. Барышникова, А.В. Караулов, П.К. Иванов, Л.В. Демидов, А.Ю. Барышников
**ИЗМЕНЕНИЕ СЫВОРОТОЧНОГО УРОВНЯ $\beta 2$ -МИКРОГЛОБУЛИНА
 У БОЛЬНЫХ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ**..... 57

Г.С. Емельянова, В.А. Горбунова, Н.В. Любимова, Н.Ф. Орел, А.А. Маркович, В.Ю. Сельчук
**ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ
 ИСХОДНОГО УРОВНЯ ХРОМОГРАНИНА А У БОЛЬНЫХ НЭО**..... 63

А.Н. Копылов, Н.Ю. Анисимова, Т.Х. Тенчурун, Т.Е. Григорьев, А.Ю. Хоменко, М.В. Киселевский
ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МАТРИКСА ИМПЛАНТАТА ТРАХЕИ..... 67

О.А. Бочарова, Е.В. Бочаров, Р.В. Карпова, А.А. Вершинская, Ю.Н. Соловьев
**СНИЖЕНИЕ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ГЕПАТОМ
 ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ФИТОАДАПТОГЕНА У ВЫСОКОРАКОВЫХ МЫШЕЙ СВА**..... 73

А.Ю. Барышников, Б. Альбассит, Е.В. Игнатьева, В.П. Краснов, И.И. Краснюк
**РАЗРАБОТКА ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ
 ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ
 НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО НИТРОЗОМОЧЕВИНЫ OR-2011**..... 77

А.Н. Балаев, В.Н. Осипов, К.А. Охманович, В.Е. Фёдоров
**ПОЛУПРОМЫШЛЕННЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА 7-8 ФРАГМЕНТА ОКТРЕОТИДА
 И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ**..... 85

Ю.Г. Паяниди, К.И. Жордания, Е.Г. Тырсина, В.Ю. Сельчук, Т.П. Казубская, А.Ю. Кашурников
**ХИРУРГИЧЕСКАЯ ТАКТИКА
 В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ТОЛСТОЙ КИШКИ И СИНДРОМЕ ЛИНЧА**..... 89

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

К.И. Жордания, Ю.Г. Паяниди, Е.В. Калиничева
НОВАЯ ПАРАДИГМА В ЭТИОЛОГИИ СЕРОЗНОГО РАКА ЯИЧНИКОВ..... 95

Материалы Всероссийской научно-практической конференции
 с международным участием «Противоопухолевая терапия:
 от эксперимента к клинике», Москва, 20–21 марта 2014..... 10; 28

Олег Николаевич Чупахин
 к 80-летию со дня рождения

Правила оформления статей для публикации..... 46; 56; 72

УДК 616-006.484-085.2/3:616-092.9+611.013.68

И.С. Брюховецкий

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO* ПОСЛЕ КУРСА ХИМИОТЕРАПИИ
НА МОДЕЛИ ГЛИОБЛАСТОМЫ У КРЫС***Дальневосточный федеральный университет Школа биомедицины, Владивосток***Контактная информация***Брюховецкий Игорь Степанович, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной нейробиологии***адрес:** 690950 г. Владивосток, ул. Суханова, 8; **тел. +7(914)723005003****e-mail:** bruhovetsky@mail.ru

Статья поступила 08.10.2014, принята к печати 24.11.2014.

Резюме

МГБ – одна из самых агрессивных, злокачественных, глиальных опухолей человеческого организма. Стандартом лечения является хирургическая резекция, облучение и химиотерапия темозоламидом. Прогноз крайне неблагоприятный. Медиана выживаемости составляет 12–15 месяцев. Высокую резистентность глиальных опухолей связывают с опухолевыми стволовыми клетками. Феномен направленной миграции здоровых стволовых клеток к опухолевому очагу открывает новые перспективы в лечении МГБ. ГСК наименее вовлечены в нейроканцерогенез и могут быть использованы для совершенствования и оптимизации протоколов лечения МГБ.

Целью данной работы стало изучение эффективности и перспектив клинического применения препарата мобилизованных стволовых клеток после курсового введения темозоламида крысам с экспериментальной глиомой линии С6.

Эксперимент выполнен на 130 крысах линии Вистар с глиомой С6. Животные были разделены на 4 группы: контрольную; группу получавших темозоламид; группу получавших биомедицинский препарат мобилизованных стволовых клеток и группу получавшую биомедицинский препарат мобилизованных стволовых клеток после курса химиотерапии темозоламидом. Продолжительность эксперимента – 70 дней.

Наименьшее значение объёма глиомы выявлено у крыс, получивших темозоламид $115,76 \pm 16,25 \text{ мм}^3$ и у животных группы темозоламид + клетки $114,74 \pm 5,54 \text{ мм}^3$, что было достоверно ($p < 0,05$) меньше размеров неопластического узла у животных в контрольной группе – $202,09 \pm 39,72 \text{ мм}^3$.

Животные из группы «темозоламид+клетки» жили достоверно дольше крыс контрольной группы или получавших только химиотерапию. Имплантированные клетки мигрируют из области введения в неопластический очаг и взаимодействуют с клетками глиомы, но механизмы этого явления нуждаются в дальнейшем изучении.

Ключевые слова: мультиформная глиобластома, темозоламид, стволовые клетки, нейральные стволовые клетки, опухолевые стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки.

I.S. Bryukhovetskiy

**EFFICIENCY OF STEM CELL PREPARATION
IN THE EXPERIMENT *IN VIVO* AFTER A COURSE
OF CHEMOTHERAPY ON THE EXPERIMENTAL MODEL OF GLIOBLASTOMA IN RATS***School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok***Abstract**

MGB is one of the most aggressive, malignant glial tumors of the human body. Standard treatment is surgical resection, radiation, and chemotherapy temozolomide. Prognosis is extremely poor. Median survival is 12–15 months. High resistance of glial tumors is associated with tumor stem cells. The phenomenon of directional migration of healthy stem cells to tumor foci opens new perspectives in the treatment of the MGB. HSCs are the least involved in neurotumorigenesis and can be used to improve and optimize treatment protocols MGB.

Objective: To study the prospects for the use of biomedical drug mobilized stem cells in treatment of rats with experimental glioblastoma.

The experiment was performed on 130 Wistar rats with glioma C6. Animals were divided into the control group, the group of animals treated with Temozolomide, the group of animals treated only biomedical cell preparation of stem cells and the group of rats treated with biomedical cell preparation of stem cells after the chemotherapy course Temozolomide. The duration of experiment – 70 days. Used complex biotechnology, surgical, neuroimaging morphological and physiological methods.

The smallest value of the volume of glioma was found in rats receiving temozolomide $115,76 \pm 16,25 \text{ mm}^3$ and party animals temozolamide + cells $114,74 \pm 5,54 \text{ mm}^3$, which was significantly ($p < 0,05$) than the size of a neoplastic node in the control group $202,09 \pm 39,72 \text{ mm}^3$.

Animals from group "temozolamide + cells" lived significantly longer than control rats receiving only chemotherapy or. Implanted cells migrate from the introduction of neoplastic foci and interact with glioma cells, but the mechanisms of this phenomenon need to be further explored.

Key words: glioblastoma multiforme, Temozolomide, stem cells, neural stem cells, tumor stem cells, hematopoietic stem cells.

Введение

Мультиформная глиобластома – одна из самых агрессивных первичных злокачественных, глиальных опухолей головного мозга человека [17; 18]. Несмотря на все достижения медицинской науки, сегодня, при условии выполнения всех современных терапевтических протоколов, медиана выживаемости больных с МГБ составляет 12–14 месяцев [25]. Крайне низкую эффективность лечения принято объяснять запоздалой диагностикой, большим числом диагностических ошибок, высокой степенью инфильтрации паренхимы мозга опухолевыми клетками, специфическими особенностями, связанными с локализацией опухоли в замкнутой полости черепа в непосредственной близости от жизненно важных центров мозга.

Высокую резистентность МГБ к облучению и химиотерапии в последние годы связывают с ОСК – особой популяцией клеток новообразования, обладающими способностью восстанавливать поврежденную ДНК, беспрепятственно мигрировать в пределах паренхимы мозга и имеющих ряд других стратегических предпочтений [1; 3; 6; 34].

Фармацевтических препаратов, способных направленно уничтожить ОСК, сегодня не существует. Изучается возможность поражения только отдельных мишеней в ОСК. Например, иматиниб нарушает сигнализацию рецептора к фактору роста тромбоцитов PDGFR и блокирует сигнальный путь MAPK [19]. Рапамицин инактивирует ген *PTEN*, а циклопамин прерывает сигнальный путь Wnt/Sonichedgehod [20; 27]. При этом, будучи ограниченно эффективны против ОСК, эти препараты не способны поражать интерфазные опухолевые клетки, рассеянные по веществу мозга. Попытки использовать для этой цели прокарбазин (натулан), ломустин (CCNU), нимустин (ACNU), фотемустин (мюстофоран), дакарбазин, иринотекан, аранозу, лизомустин и даже темозоламид, используемые для лечения меланомы, пока еще не увенчались успехом [9; 12; 24].

Применение моноклональных антител тоже нельзя назвать решением проблемы. Эффективность антител к белкам ОСК CD133 пока не доказана. Иппилимумаб (антитело, связывающее белок CTLA4) не проникает в гипоксические зоны опухоли. Бевацизумаб угнетает костномозговое кровообращение и повышает риск кровотечений, а ингибиторы тирозинкиназы эрлотиниб и иматиниб пока имеют только хорошие перспективы [30]. Появление липосомальных и таргетных препаратов существенно не изменило показателей выживаемости больных с МГБ и другими глиальными опухолями головного мозга [4; 10; 11; 13].

Важнейшим этапом в процессе разработки новых биомедицинских решений для терапии МГБ стало открытие феномена направленной миграции стволовых клеток в опухолевый очаг [6]. Главная роль в этом процессе отводится фактору стромальных клеток SDF-1 α или CXCL12, хемокину подсемейства CXC [28]. Данный лиганд связывается с рецепторами CXCR4 и CXCR7 мембраны стволовой клетки и индуцирует миграцию. SCF, HGF, VEGF, MCP-1, HMGB1, uPA и ряд других лигандов выступают модераторами этого процесса. Применение стволовых клеток позволяет преодолеть гематоэнцефалический барьер, воздействовать на опухолевые клетки, рассеянные в паренхиме мозга, и проникать в гипоксические зоны опухоли [6]. Однако воздействие на ОСК требует специфического подхода, соответствующего особой роли и степени сложности этого объекта.

Общность иммунофенотипических кластеров дифференцировки, единство основных генов и эпигенетических механизмов, регулирующих ключевые жизненные процессы, сходство протеомного и транскриптомного профилей свидетельствует о том, что ОСК инвазивных глиальных опухолей является продуктом патологической эволюции НСК головного мозга человека [7]. НСК, будучи инструментом локального тканевого гомеостаза, постоянно мигрируют из герминативных зон мозга и взаимодействуют с нейронами и глиальными клетками. Межклеточное взаимодействие служит основным фактором согласованной регуляции метаболизма, запускает программы выживания, детерминации, дифференцировки, адаптации, пролиферации и апоптоза. Индукционное взаимодействие между НСК и патологически измененными клетками запускает в них естественные механизмы клеточной гибели [2; 5; 14].

Очевидно, что трансплантация стволовых клеток, сохранивших свой регуляторный потенциал, может стать важнейшим направлением модернизации современных протоколов комплексного лечения глиальных опухолей головного мозга [15]. Создание систем соматических и стволовых клеток с заданными свойствами – одно из приоритетных направлений мировой биомедицины. Вместе с тем очевидно, что технологии и методы перепрограммирования клеточных систем, основанные на трансфере ядра соматической клетки в цитоплазму ооцита, слияния двух соматических клеток с плюрипотентными свойствами, трансфекции с использованием вирусов, как и ряд других генно-инженерных технологий, еще долго не найдут своего места в практической медицине. Возможные генетические последствия и риск вреда для здоровья пациента от применения данных клеточных систем «перечеркивает» все их достоинства и не позволяет рассматривать их в ближайшей перспективе как стратегию выбора в лечении МГБ. Не менее туманными представляются перспективы клинического использования эмбриональных СК в связи с наличием ряда не решаемых вопросов о способах их контроля в организме пациента и серьезных морально-этических проблем их получения.

В 2013 году наша исследовательская группа завершила первый блок экспериментов по сравнительному протеомному картированию и биоинформационному анализу лизатов НСК человека (CD133⁺), выделенных из обонятельной выстилки носа человека, мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD34⁺) костного мозга и CD133⁺ ОСК глиобластомы человека линии U87 [7]. Установлено, что наибольшая степень протеомных отличий свойственна стволовым клеткам костного мозга, и это позволяет предположить, что они сохранили естественный циторегуляторный потенциал.

Ряд специализированных онкологических учреждений в России и за рубежом на протяжении ряда лет успешно использует препарат мобилизованных аутологичных стволовых клеток периферической крови, основу которого составляют сепарированные мононуклеарные клетки с высоким содержанием гемопоэтических стволовых клеток [8]. Глубина протеомных отличий этого типа клеток от НСК и ОСК МГБ позволяет предположить, что трансплантация клеток этого типа уже сегодня может быть инструментом повышения эффективности стандартных схем лечения глиальных опухолей головного мозга.

Целью данной работы стало изучение эффективности и перспектив клинического применения препарата мобилизованных стволовых клеток после курсового введения темозоламида крысам с экспериментальной глиомой линии С6.

Материалы и методы

Дизайн исследования

Эксперимент выполнен на 130 половозрелых крысах-самках линии Wistar массой тела 200–220 грамм в начале эксперимента. Животные были разделены на четыре группы.

Контрольную группу составили животные с глиомой С6 (N = 30).

Вторая группа сформирована из крыс с глиомой, которым была проведена терапия темозоламидом по стандартной схеме (группа «темозоламид», N = 30).

Третью группу составили крысы с глиомой С6, которым были трансплантирован препарат гемопозитических стволовых клеток (ГСК) далее, группа «клетки», N = 30).

Четвертая группа состояла из крыс с глиомой С6, которым после терапии темозоламидом проводилась стереотаксическая имплантация ГСК в перипухоловое пространство (группа «темозоламид + клетки» N = 30).

Отдельную группу составляли ложно оперированные животные (N = 10).

В работе использован комплекс хирургических, культуральных, морфологических и нейровизуализационных методов. Крыс наблюдали в течение 70 дней. Максимум внимания был уделен продолжительности жизни животных. При ухудшении состояния крыс выводили из эксперимента путем глубокого наркоза. Эксперимент был повторен три раза. Содержание и уход за животными осуществлялся в соответствии с требованиями стандартов GLP и Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным. Экспериментальная часть работы, в том числе использование человеческого материала для исследовательских целей, одобрена этическим комитетом Школы биомедицины Дальневосточного федерального университета (протокол № 12 от 14.12.2013).

Культура клеток глиомы линии С6

В работе использована глиома крыс линии С6, предоставленная сотрудниками лаборатории фундаментальной и прикладной нейробиологии Государственного научного центра имени В.П. Сербского (Россия, Москва). Быстро прогрессирующая клеточная линия этой опухоли получена на крысах Wistar–Furth путем индукции канцерогенеза N, N-нитрозометилмочевинной. По морфологии, характеру инвазивного роста и спектру белков глиома С6 наиболее близко соответствует МГБ человека [18; 35].

Для проведения эксперимента аликвоту, содержащую 10^6 опухолевых клеток, размораживали в течение 10 мин при 37°C , отмывали от ДМСО средой DMEM с 10% FBS и добавлением антибиотика-антимикотика « $\times 100$ », содержащего 10 000 ед/мл пенициллина, 10 000 мкг/мл стрептомицина, и 25 мкг/мл фунгицида (все – производства компании Gibco®). Клетки осаждали центрифугированием, добавляли свежую среду, и высаживали в 50 мл культуральные матрасы (Costar).

Культивирование продолжали до образования монослоя. После этого клетки снимали путем

ферментативной диссоциацией (0,05% trypsin-EDTA 1 : 4, 10 мин, $+37^\circ\text{C}$), центрифугировали (120 g, 6 мин), супернатант сливали, добавляли свежую среду, и ресуспендировали. Моделирование опухоли выполнялись под общим наркозом. Наркоз проводили посредством введения 200 мкл смеси, содержащей золетил и рамитар в соотношении 1 : 4 внутривенно. Клетки глиомы в количестве 10^6 имплантировали в область каудопутамена с помощью стереотаксического аппарата Nargishige (Japan) по координатам атласа мозга крысы Swanson: Ap-1; L 3,0; V 4,5, TBS-2,4 мм с помощью гамльтоновского шприца со скоростью 3 мкл/мин в объеме 20 мкл [31]. Перед введением часть клеток глиомы С6 была обработана Vybrant® CFDA SE Cell Tracer по методике производителя – компании Molecular Probes® (№ V12883).

Препарат

мобилизованных стволовых клеток (ГСК)

Препарат мобилизованных стволовых клеток человека был предоставлен «Клиникой восстановительной и интервенционной неврологии и терапии «Нейровита» (г. Москва).

Подробное описание клеточного препарата представлено ранее [8]. Согласно сопроводительной документации содержание моноклеарных клеток с маркером клеточной поверхности $\text{CD}34^+/\text{CD}45^+$ в препарате составляло 1,2 %. После размораживания клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10 % FBS, FGF, EGF и антибиотик-антимикотик « $\times 100$ » (все производства компании Gibco®). Перед трансплантацией препарат ГСК был обработан флуоресцирующим красителем CellTracker™ Red CMTPX по методике производителя – компании Molecular Probes® (№ C34552).

Препарат в количестве 10^6 клеток вводили в перипухоловое пространство мозга животным с глиомой С6 на 10 сутки после имплантации клеток глиомы. Предварительное исследование показало, что в течение 10 дней объем глиомы увеличивался в два раза, таким образом, соотношение клетки глиомы/клеточный препарат составляло 2 : 1. У ложно оперированных животных в область каудопутамена вводили 20 мкл среды DMEM (Gibco).

Химиотерапия

Стандартом химиотерапии инвазивных глиом является темозоламид – цитостатический химиопрепарат препарат алкилирующего действия. Препарат быстро проникает в системный кровоток и превращается в активный метаболит, цитотоксическое действие которого обусловлено алитированием гуанина в положениях O^6 и N^7 , что нарушает структуру и синтез ДНК [22].

В работе был использован препарат производства Shering–Plough Labo N.V. (Belgia) под торговым названием Temodal®. На 10 сутки после имплантации клеток глиомы животным проводили МРТ. При наличии четко визуализируемой опухоли животные соответствующих групп получали перорально темиозоламид в дозе 50 мг/кг массы тела с 10 по 14 день эксперимента.

Нейровизуализационное исследование

МРТ головного мозга проводили на МР-томографе Biospec (Bruker) под общим наркозом с применением специальной магнитной катушки для мелких лабораторных животных. МРТ выполняли на 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 дни эксперимента.

Неврологический статус и масса тела

Исследование неврологического статуса у крыс выполнено согласно стандартному алгоритму [33]. Измерение массы тела проводили с использованием лабораторных весов Sartorius CPA12001S.

Морфологическое исследование

Срезы толщиной 40 мкм окрашивали крезильным фиолетовым, толуидиновым синим и гематоксилином-эозином согласно стандартному протоколу. Для визуализации очагов некроза использован метод И.В. Викторова [36]. В работе использованы: система визуализации живых клеток LSM 5 Karl Zeis Pascal, конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Carl Zeiss LSM 710, система мультифотонной лазерной микроскопии производства компании «Olympus». Для работы с изображением применялась программы 3D for LSM Version 1.4.2 и ImageJ (США).

Морфометрия опухоли

Объем глиомы определяли по формуле:

$$V = \frac{4}{3\pi} abc, \text{ где}$$

a, b, c – полуоси эллипсоида. Первоначально находили срез с максимальной площадью глиомы, на котором определяли большую полуось (a) и малую полуось эллипсоида (b). Затем путем суммирования толщины фронтальных срезов на расстоянии от переднего до заднего полюса опухолевого узла находили переднезаднюю полуось (c).

Статистический анализ проведен с использованием MS Excel 2010. Обработка изображений выполнена с использованием программы ImageJ (USA).

Результаты

Стереотаксическая имплантация клеток глиомы С6 в головной мозг экспериментальных животных привела к формированию объемных опухолей. На МРТ сканах выявлялось объемное новообразование неправильной формы с признаками сдавления желудочков мозга, очагами кровоизлияний, явления отека и компрессии мозговых структур (рис. 1). Морфологическое исследование выявляло опухоль с нечеткими границами, участками инвазии в мозговую паренхиму и отеком прилегающего белого вещества (рис. 2; см. вклейку).

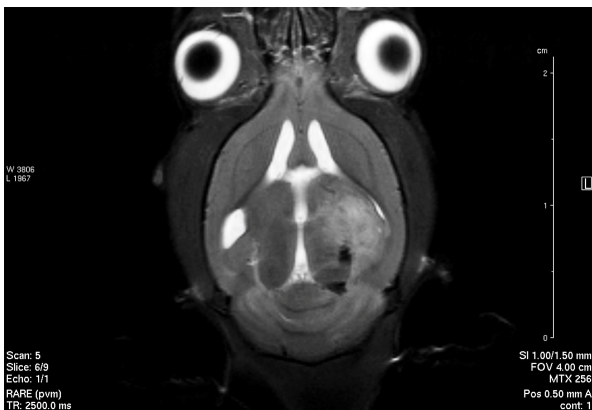


Рис.1. Магнитно-резонансное изображение мозга крысы через семь дней после имплантации клеток глиомы С6. Видны признаки сдавления желудочков мозга, отека и дислокации срединных мозговых структур. T² – режим TurboRARE.



Рис. 5. Выживаемость экспериментальных животных в ходе эксперимента.

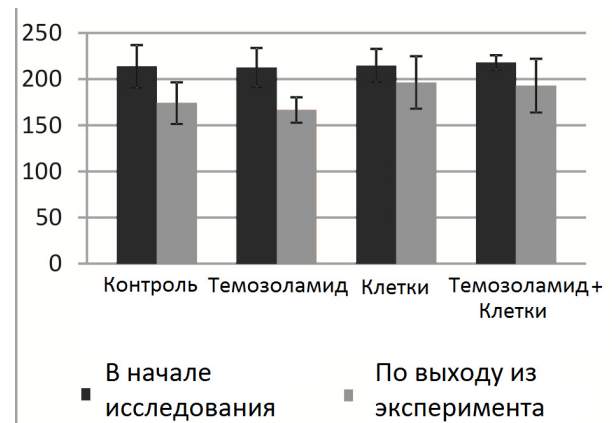


Рис. 6. Динамика массы тела животных в эксперименте.

Опухоль состояла из клеток различной формы и величины, которые содержали разное число ядер. Распространение опухоли происходило по перивазальным и переневральным пространствам. Ацидофильные клетки селективно окрашивались ванадиевоокислым фуксином в гранатовый цвет и обнаруживали обширные зоны центрального некроза, местами трансформирующиеся в кисты (рис. 3). Флуоресценция, вызванная аргоновым лазером (λ 488 nm), обнаружила неоднородное распределение неопластических элементов в паренхиме опухоли и тенденцию к их миграции в прилежащие ткани (рис. 4).

Средняя продолжительность жизни животных контрольной группы составила $27,23 \pm 5,82$ дня с момента операции (рис. 5). Животные быстро теряли массу тела (рис. 6), были вялыми, не проявляли интереса к событиям, происходящим в клетке, отказывались от еды, неохотно пили. Попытка взять животное в руки или осторожное прикосновение к вибриссам сопровождались пронзительным визгом. Неврологическая симптоматика нарастала быстро. Не грубые симптомы в виде птоза, тремора и неглубоких парезов конечностей быстро сменялись параличами, сопровождаемыми появлением на стороне опухоли экзофтальма с последующим развитием комы и дыхательных нарушений, что очевидно было обусловлено дислокационным синдромом. В свою очередь ложно оперированные животные не обнаружили значимых изменений массы тела и функционального статуса и благополучно дожили до конца эксперимента.

Средняя продолжительность жизни животных группы «темозоламид» составила $46,2 \pm 3,6$ дней с момента начала эксперимента (рис. 5). Животные этой группы не обнаруживали принци-

альных различий в показателях массы тела по сравнению с контролем (рис. 6), неохотно принимали пищу и были очень вялыми. Общее состояние животных было менее тяжёлым, характеризовалось большей стабильностью и менее резким развитием тяжелых неврологических нарушений. Мозговая симптоматика проявлялась в виде двустороннего полуптоза, негрубых спастических парезов конечностей в сочетании с судорожными подергиваниями лапок. Заторможенность сменялась эпизодами возбуждения в виде манежных движений в пределах клетки, что свидетельствовало о поражении одного из полушарий. Картина морфологических изменений, выявляемых при исследовании головного мозга животных, выбывших из эксперимента, не отличалась от таковой в контрольной группе.

Средняя продолжительность жизни животных с глиомой С6, получивших трансплантацию препарата мобилизованных стволовых клеток, составила $49,56 \pm 1,94$ дней с момента начала эксперимента. Эти показатели достоверно отличаются от крыс контрольной группы, однако не обнаруживают значительных различий по сравнению с группой животных, получивших темозоламид. Неврологическое обследование, проводимое в ходе эксперимента, выявляло негрубые неврологические симптомы: снижение роговичного рефлекса, птоз и экзофтальм на стороне опухоли, снижение сгибательных и хва-

тательных рефлексов, увеличение времени реакции на световые и звуковые раздражители, замедление при тесте встряхивания головы. Эти животные длительное время оставались более активными по сравнению с таковыми группы контроля, не отказывались от еды и не обнаруживали значительной потери массы тела.

Морфологическое исследование выявляло объемное образование с нечеткими границами и участками инвазии в вещество мозга.

Имплантированные клетки визуализировались как в области введения, так и на некотором расстоянии от нее. Клетки имели шаровидную форму и не образовывали отростков (рис. 7; 8). Очевидно, в процессе роста глиомы они мигрировали вслед за неопластическими клетками в паренхиму мозга, и возможно, как-то взаимодействовали с ними. На 30 день исследования воздействие лазера (λ 650 nm) не вызвало флуоресценции трансплантированных клеток, что, возможно, связано с их гибелью, дифференцировкой или вовлечением в опухолевый процесс. Продолжительность жизни животных, получивших химиотерапию с последующим введением препарата мобилизованных стволовых клеток, составила $62,8 \pm 4,85$ дня, что достоверно выше подобного показателя в контроле и в группе «темозоламид».

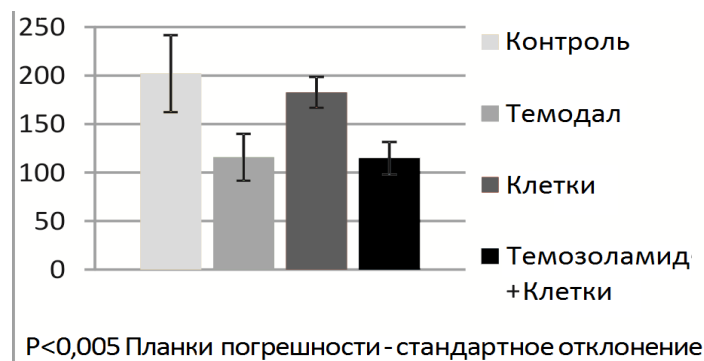


Рис. 9. Объем опухолевого узла, мм³.

Животные не обнаруживали значительной потери массы тела, длительно сохраняли активность и не отказывались от еды. Неврологическое исследование выявляло негрубые неврологические симптомы с последующим резким развитием комы и витальных нарушений. Объем опухоли у экспериментальных животных существенно различался (рис. 9). Наименьшее значение объема глиомы выявлено у крыс, получивших темозоламид, – $115,76 \pm 16,25$ мм³ и у животных группы «темозоламид + клетки» – $114,74 \pm 5,54$ мм³. Это значение было достоверно ($p < 0,05$) меньше размеров неопластического узла в контрольной группе $202,09 \pm 39,72$ мм³, и существенно меньше, чем в группе крыс, получивших только клеточную терапию, $182,72 \pm 15,96$ мм³.

Обсуждение

С позиций антагонистического взаимоотношения ОСК и здоровых НСК развитие опухоли в головном мозге следует понимать, как результат локального преобладания и функционального доминирования СК неопластического вида. Культура глиомы С6 имеет 87,24 % CD133⁺ ОСК [35], это её

стратегическое преимущество перед другими моделями инвазивных глиом. Трансплантация клеток глиомы линии С6 приводит одномоментному срыву механизмов ауторегуляции тканевого гомеостаза в мозге крысы, количественное преимущество позволяет ОСК быстро сформировать сосудистую, лимфатическую и нейральную сети, оптимизировать метаболизм и беспрепятственно, с максимальной скоростью запустить инвазивные процессы, что объясняет тяжесть состояния и высокую смертность животных в контрольной группе.

Темозоламид достоверно уменьшает объем глиомы, что было доказано в нашем эксперименте и соответствует данным литературы [32]. Цитотоксическое действие препарата в отношении опухолевых клеток редуцирует объем опухолевого узла, но резко усиливает гипоксию, что очевидно, способствует выброске хемокинов, индуцирующих процессы направленной миграции СК в опухолевый очаг. Появление такого фактора как мигрировавшие в очаг нормальные СК, резко смещает равновесие в противоположную сторону, что объясняет увеличение продолжительности жизни экспериментальных животных – главного критерия компенсации в данной системе.

Трансплантированные ГСК способны замедлять интенсивность пролиферации опухолевых клеток, что делает их восприимчивыми к регуляторным сигналам апоптоза и аутофагии. Активизация рецепторов TNF, NGFR, CAR1, TRAIL, EGFR, IGF1R, CD 95 и трансмембранных белков DR3, DR4, RD5 при взаимодействии с ГСК индуцирует в опухолевых клетках апоптоз [14]. При совместном культивировании опухолевых клеток с ГСК в среде накапливается циклина E, D2, что блокирует пролиферацию опухолевых клеток в фазе G₀/G₁ [6; 32]. Смерть клеток глиомы С6 при взаимодействии с ГСК может быть вызвана нарушением внутриклеточного гомеостаза ионов кальция, а интруктивный специфический сигнал передан через щелевые межклеточные контакты посредством BMP4 и интерлейкина-1 [21]. Нейропластическое действие СК и продукцию биологически активных веществ СК в патологическом очаге также следует отнести к числу механизмов противоопухолевого действия ГСК [23; 29]. Необходимо отметить, что судьба ксенотрансплантата в нашем эксперименте была определена изначально. Некоторая степень иммуносупрессии, вызванная гормонами или цитостатиками, может отсрочить моменты гибели трансплантированных в мозг крысы человеческих клеток. В контексте эксперимента это позволяет рассматривать ГСК как клеточные системы с индуцированным апоптозом. Мы сообщали о возможности развития апоптоза в клетках глиальных опухолей при взаимодействии с НСК и клетками-предшественницами гемопоэза. Эти клеточные системы при совместном культивировании с клетками глиомы С6 и глиобластомы U87 индуцируют в них апоптоз и замедляют темпы развития неопластического процесса [21]. Возможно, именно этот механизм редуцирует объем опухолевого узла и улучшает общее состояние

крыс в ходе эксперимента. Нельзя исключить и того факта, что гибель клеток опухоли активизирует механизмы выживания ОСК, выступает как фактор селекции, отбирающий наиболее агрессивные и резистентные клеточные элементы [26].

Результаты эксперимента позволяют сделать принципиально важный вывод: крысы с глиомой С6, получившие трансплантацию биомедицинского препарата мобилизованных стволовых клеток в сочетании с химиотерапией, живут достоверно ($p < 0,05$) дольше животных, получавших только темозоламид. Таким образом, выживаемость как главный критерий эффективности терапии в онкологии, достоверно увеличивается с использованием клеточной трансплантации. Идентификация механизмов этого явления и разработка более тонких методов и деликатных технологий управления процессами клеточной индукции входят в число приоритетных задач ближайшего будущего. Наши результаты позволяют рассматривать биомедицинский препарат мобилизованных стволовых клеток как перспективный инструмент регуляции и управления неопластическими процессами в глиальной опухоли, что открывает возможность разработки новых стратегий лечения этих нейроонкологических болезней.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 14.575.21.0038).

Автор выражает благодарность за методологическую помощь и продуктивное научное сотрудничество сотрудникам Государственного научного центра имени В.П. Сербского, Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина, клиники восстановительной и интервенционной неврологии «Нейровита».

Литература

1. Алексеева И.С., Кулаков А.А., Гольдштейн Д.В. и др. Результаты клинко-экспериментального исследования по использованию комбинированного клеточного трансплантата на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани для восстановления дефектов костной ткани // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 967–69.
2. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Программированная клеточная смерть (апоптоз) // Российский онкологический журнал. – 1996. – №1. – С. 58.
3. Барышников А.Ю. Взаимодействие опухоли и иммунной системы организма // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4, № 3. – С. 127–130.
4. Барышникова М.А., Грищенко Н.В., Бузова О.Н. и др. Роль CD95/Fas рецептора в индукции апоптоза противоопухолевыми препаратами // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 9–14.
5. Боценовский В.А., Барышников А.Ю. Молекулы клеточной адгезии // Успехи современной биологии. – 1994. – Т. 114, № 6. – С. 741.
6. Брюховецкий И.С., Брюховецкий А.С., Мищенко П.В., Хотимченко Ю.С. Роль системных механизмов миграции и хоуминга стволовых клеток в развитии злокачественных опухолей центральной нервной системы и разработке новых методов противоопухолевой терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т.12, № 4. – С. 3–12.
7. Брюховецкий А.С., Шевченко В.Е., Чехонин В.П. и др. Сравнительное протеомное картирование опухолевых стволовых клеток, выделенных из глиобластомы линии U87, нейрональных стволовых и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека: от каталогизации клеточных белков к инновационной парадигме протеом-основанной клеточной терапии опухолей // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. 8, № 2. – С. 85–92.
8. Брюховецкий И.С. Травма спинного мозга: клеточные технологии в лечении и реабилитации. – М.: Практическая медицина, 2010. – 341 с.
9. Горбунова В.А., Манзюк Л.В., Демидов Л.В., Харкевич Г.Ю. Лизомустин – отечественный препарат из группы производных нитрозомочевины для лечения меланомы кожи // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 55–6.
10. 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. – Т. 13, № 1. – С. 37–42.
11. Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Санарова Е.В. и др. Наноструктурированные системы доставки

- противоопухолевых препаратов // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 21–7.
12. Лихванцева В.Г., Оборотова Н.А., Когония Л.М. и др. Первый опыт применения аранозы в лечении увеальных меланом // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 3. – С. 34–9.
 13. Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Липосомальные лекарственные формы в клинической онкологии // Успехи современной биологии. – 2009. – Т. 121, № 5. – С. 464.
 14. Пальцев М.А., Иванов А.А., Северин С.Е. Межклеточные взаимодействия. М.: Медицина, 2003. – 288 с.
 15. Пальцев М.А., Смирнов В.Н. Терапевтический потенциал клеток пуповинной крови при негематологических заболеваниях. – М. ОАО Издательство «Медицина», 2011. – 176 с.
 16. Уласов И.В., Каверина Н.В., Кадагидзе З.Г., Барышников А.Ю. Антиглиомная аденовирусная виротерапия: механизм, регуляция и клинические перспективы // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 11–8.
 17. Уласов И.В., Каверина Н.В., Барышников А.Ю. Роль сурвивина в диагностике и терапии опухолей головного мозга // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 71–6.
 18. Barth R.F., Kaur B. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 // J. Neurooncol. – 2009. – 94(3). – P. 299–312.
 19. Dong Y., Han Q., Zou Y. et al. Long-term exposure to imatinib reduced cancer stem cell ability through induction of cell differentiation via activation of MAPK signaling in glioblastoma cells // Mol Cell Biochem. – 2012. – 370(1–2). – P. 89–102.
 20. Eimer S., Dugay F., Airiau K. et al. Cyclophamide cooperates with EGFR inhibition to deplete stem-like cancer cells in glioblastoma-derived spheroid cultures // Neuro Oncol. – 2012. – 14(12). – P. 1441–51.
 21. Grobden B., De Deyn P.P., Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion // Cell Tissue Res – 2002. – 310(3). – P. 257–70.
 22. Hirst T.C., Vesterinen H.M., Sena E.S. et al. Systematic review and meta-analysis of temozolomide in animal models of glioma: was clinical efficacy predicted? // Br J Cancer. – 2013. – 108(1). – P. 64–71.
 23. Hou L., Wang X., Zhou Y. et al. Inhibitory effect and mechanism of mesenchymal stem cells on liver cancer cells // Tumour Biol. – 2014. – 35(2). – P. 1239–50.
 24. Hottinger A.F., Stupp R., Homicsko K. Standards of care and novel approaches in the management of glioblastoma multiforme // Chin J Cancer – 2014. – 33(1). – P. 32–9.
 25. Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D. et al. The 2007 WHO Classifications of Tumors of central nervous system // Acta neuropathol. – 2007. – 114(2). – P. 97–109.
 26. Liu J., Zhang Y., Bai L. et al. Rat bone marrow mesenchymal stem cells undergo malignant transformation via indirect co-cultured with tumour cells // Cell Biochem Funct. – 2012. – 30(8). – P. 650–6.
 27. Mendiburu-Eliçabe M., Gil-Ranedo J., Izquierdo M. Efficacy of rapamycin against glioblastoma cancer stem cells // Clin Transl Oncol. – 2014. – 16(5). – P. 495–502.
 28. Nagasawa T. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4 // J Mol Med (Berl). – 2014. – 92(5). – P. 433–9.
 29. Pittenger M.F. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. Methods in molecular biology // Methods Mol Biol. – 2008. – 449. – P. 27–44.
 30. Rovere R.K. Bevacizumab as secondline treatment of glioblastoma – worth the effort? // Klin Onkol. – 2014. – 27(3). – P. 219–20.
 31. Swanson L.W. Brain Maps: Structure of the Rat Brain. 2nd Edition. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B. V, 1998.
 32. Shen W., Hu J.A., Zheng J.S. Mechanism of temozolomide-induced antitumor effects on glioma cells // J Int Med Res. – 2014. – 42(1). – P. 164–72.
 33. Tupper D.E., Wallace R.B. Utility of the neurological examinations in rats // Acta Neurobiol Exp (Wars). – 1980. – 40(6). – P. 999–1003.
 34. Tamura K., Aoyagi M., Ando N. et al. (Expansion of CD133-positive glioma cells in recurrent de novo glioblastomas after radiotherapy and chemotherapy // J. Neurosurg. – 2013. – 119(5). – P. 1145–55.
 35. Shen G., Shen F., Shi Z. et al. Identification of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line and the limitation of current identification methods // In Vitro Cell Dev Biol Anim. – 2008. – 44(7). – P. 280–9.
 36. Victorov I.V., Prass K., Dirnagl U. Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin // Brain Res. Protoc. – 2000. – 5. – P. 135–39.

СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ГСК (HSCs)	– гемопозитические стволовые клетки (Hematopoietic stem cells)
МГБ (MGB)	– мультформная глиобластома (Glioblastoma multiforme)
МРТ	– магнитно-резонансная томография
ОСК	– опухолевые стволовые клетки
СК	– стволовые клетки
НСК	– нейральные стволовые клетки

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>М.А. Барышникова, Н.В. Грищенко, О.С. Бурова, Д.В. Новиков, Д.А. Афанасьева, С.А. Полозкова, А.П. Полозкова, Н.А. Оборотова, В.В. Новиков, А.Ю. Барышников, М.И. Давыдов</i> РОЛЬ CD95/FAS-РЕЦЕПТОРА В ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ ПРЕПАРАТАМИ	3
<i>Д.С. Чельшева, А.М. Бурденный, Д.С. Ходырев, И.В. Пронина, И.К. Воронников, В.Д. Ермилова, В.Ю. Сельчук, Т.П. Казубская, Э.А. Брага, В.И. Логинов</i> ГИПЕРМЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНОВ RASSF1A И MGMT КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ЖЕНЩИН МОСКОВСКОГО РЕГИОНА	9
<i>А.А. Матюшин, О.В. Хугаева, М.А. Барышникова, И.И. Краснюк, А.Ю. Барышников</i> ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ АНТИ-CD20 ИММУНОЛИПОСОМ МИТОКСАНТРОНА IN VITRO	15
<i>А.В. Ланцова, Е.В. Санарова, Н.А. Оборотова, А.П. Полозкова, О.Л. Орлова, З.С. Шпрах, М.П. Киселева, И.Д. Гулякин, З.С. Смирнова</i> РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ИНЪЕКЦИОННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ НА ОСНОВЕ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ СУБСТАНЦИИ ПРОИЗВОДНОЙ ИНДОЛОКАРБАЗОЛА – ЛХС-1208	25
<i>А.В. Ланцова, Е.В. Санарова, Н.А. Оборотова, А.П. Полозкова, О.Л. Орлова, Е.В. Игнатъева, И.В. Яриева, А.С. Миронов, Р.С. Шакулов, С.В. Яроцкий, К.В. Лобанов</i> РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ИНЪЕКЦИОННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ НА ОСНОВЕ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ СУБСТАНЦИИ ИЗ ПУРИНОВОГО НУКЛЕОЗИДА АКВ-12	33
<i>И.Г. Меерович</i> МИЦЕЛЛЯРНЫЙ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОР НА ОСНОВЕ 4,5-ОКТАКИС(ДЕЦИЛТИО)-3,6-ОКТАХЛОРОФТАЛОЦИАНИНА ЦИНКА (ОКТАСЕНС)	41
<i>В.В. Дрожжина, Ю.С. Осичук</i> СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ БОРИРОВАННОГО ХЛОРИНА И «БОРХЛОРИНА ЛИПОСОМАЛЬНОГО ЛИОФИЛИЗАТА» ПОСЛЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ САРКОМЫ М-1 КРЫС	45
<i>Н.Ю. Кульбачевская, О.И. Коняева, М.В. Дмитриева, Н.А. Оборотова</i> ИЗУЧЕНИЕ «ОСТРОЙ» ТОКСИЧНОСТИ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ БОРХЛОРИНА	51
<i>Л.В. Винокурова, М.А. Агафонов, Г.Г. Варвагина, В.К. Финн, Е.С. Панкратова, Д.А. Добрынин</i> ПРИМЕНЕНИЕ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ТИПА ДСМ Д ЛЯ АНАЛИЗА КЛИНИЧЕСКИХ ДАННЫХ	57
<i>С.М. Адекенов, С.Н. Шин, В.С. Шнаукинта, К.К. Байзакова</i> ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА «АРГЛАБИН»	61
<i>С.В. Белкина, В.Г. Петин</i> ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ПОВЫШЕНИЯ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОМ ПРИМЕНЕНИИ ГИПЕРТЕРМИИ И ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ	65
ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ	
<i>И.В. Уласов, Н.В. Каверина, А.Ю. Барышников</i> РОЛЬ СУРВИВИНА В ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА	71
<i>В.А. Мисюрин</i> АУТОСОМНЫЕ РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫЕ ГЕНЫ	77
<i>И.С. Березкина, Т.В. Саприна, А.П. Зима, Н.В. Рязанцева, А.В. Исаева, В.Н. Латыпова, М.Р. Мухамедов, И.Н. Ворожцова</i> ПРОБЛЕМА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОГО ТЕСТИРОВАНИЯ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ УЗЛОВЫХ ОБРАЗОВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	83
<i>А.В. Лазукин</i> ЯВЛЯЕТСЯ ЛИ ФАКТОР ПРОЛИФЕРАЦИИ KI-67 КРИТЕРИЕМ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ХИМИОТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ?	95
<i>И.Д. Гулякин, Л.Л. Николаева, Е.В. Санарова, А.В. Ланцова, Н.А. Оборотова</i> ПРИМЕНЕНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ БИОДОСТУПНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ	101
<i>Е.В. Санарова, А.В. Ланцова, М.В. Дмитриева, З.С. Смирнова, Н.А. Оборотова</i> ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ – СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ СЕЛЕКТИВНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ	109
<i>Ю.П. Истомин, Т.П. Артемьева, Е.Н. Александрова, Д.А. Церковский</i> СОНОДИНАМИЧЕСКАЯ И СОНО-ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ	119
<i>М.В. Киселевский, С.М. Ситдикова, Т.Х. Тенчурин, А.Ю. Хомченко</i> СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ БИОИМПЛАНТАТА ТРАХЕИ	127
Правила оформления статей для публикации.....	70; 133-134
Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике», Москва, 20–21 марта 2014.....	8; 132

УДК 579.841.11:615.832.3:547.976

С.С. Брусов¹, Ю.С. Колоскова¹, М.А. Грин¹, И.Г. Тиганова², О.Е. Пагина¹, Э.Р. Толордава², Т.В. Степанова²,
Г.А. Меерович³, Ю.М. Романова², А.Ф. Миронов¹

НОВЫЙ КАТИОННЫЙ ПУРПУРИНИМИД ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ БИОПЛЕНОК *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

¹Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, Москва

²Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ, Москва

³Институт общей физики имени А.М. Прохорова РАН, Москва

Контактная информация

Грин Михаил Александрович, д.х.н., профессор, заместитель заведующего кафедрой химии и технологии биологически активных соединений Московского государственного университета тонких химических технологий им. М.В.Ломоносова

адрес: 119571 Москва В-571, пр. Вернадского, 86; тел. +7(495)936-89-01

e-mail: michael_grin@mail.ru

Статья поступила 28.10.2014, принята к печати 24.11.2014.

Резюме

Создан новый катионный фотосенсибилизатор для фотодинамической инактивации бактерий на основе Кремофорной дисперсии метилового эфира 133-N-(N-метилникотинил)пурпуринамида. Показана полная фотодинамическая инактивация бактерий *Pseudomonas aeruginosa* в составе биопленок при использовании этого фотосенсибилизатора в концентрации 1 мМ, времени инкубации 1 час и дозе облучения 105 Дж/см².

Ключевые слова: биопленки, фотосенсибилизаторы, фотодинамическая инактивация, пурпуринамид.

S.S. Brusov¹, Yu.S. Koloskova¹, M.A. Grin¹, I.G. Tiganova², O.E. Pagina¹, E.R. Tolordava², T.V. Stepanova²,
G.A. Meerovich³, Yu.M. Romanova², A.F. Mironov¹

NEW CATIONIC PURPURINIMIDE FOR PHOTODYNAMIC INACTIVATION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BIOFILMS

¹M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technology, Moscow

²N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

³A.M. Prokhorov General Physics Institute of Russian Academy of Sciences, Moscow

Abstract

New cationic photosensitizer for photodynamic antibacterial chemotherapy based on Chremophor dispersion of using methyl ester 13³-N-(N-methylnicotiny) purpurinimide was developed. It was shown the complete photodynamic inactivation of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by using new photosensitizer at the concentration of 1 mM, the incubation time of 1 hour and the irradiation dose of 105 J/cm².

Key words: biofilms, photosensitizer, photodynamic inactivation, purpurinimide.

Введение

Хронические инфекции, связанные со способностью патогенных бактерий к образованию биопленок, являются серьезной медицинской проблемой. Бактериальные биопленки представляют собой организованные сообщества бактерий одного или нескольких видов, окруженные экзополимерным матриксом, который защищает бактерии от воздействия антибиотиков и факторов иммунной защиты хозяина [7]. Особой устойчивостью обладают биопленки грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, широко распространенные при различных внутрибольничных инфекциях (мочеполовой системы, слизистой рта, легких), а также при нагноении ран особенно у иммунодефицитных пациентов [3; 23]. Актуальной проблемой медицинской микробиологии является поиск антибактериальных лекарственных средств нового поколения, эффективных в отношении бактерий в биопленках. Альтернативой использованию антибиотиков может стать ФДТ [1; 2; 5; 6; 8; 9].

В основе процесса фотодинамической инактивации бактерий лежат цитотоксические свойства АФК, генерируемых фотосенсибилизаторами в фо-

товозбужденном состоянии [13]. В отличие от антибиотиков, каждый из которых специфически воздействует на определенную мишень в микробной клетке, включая клеточную стенку, цитоплазматическую мембрану, процессы репликации ДНК, транскрипции или трансляции белков, АФК вызывают неспецифическое повреждение всех клеточных компонентов, потенциально подверженных окислительным реакциям [12; 22; 26]. У бактерий не развивается устойчивости по отношению к фотодинамическому воздействию, бактерицидный эффект носит локальный характер и не имеет системного действия на нормальную флору организма. Это происходит потому, что ни фотосенсибилизатор, ни световое облучение в отдельности не обладают бактерицидным действием или другими повреждающими эффектами.

В литературе описано исследование фотодинамической инактивации планктонных бактерий и биопленок культуры *Pseudomonas aeruginosa* штамма PAO1 при использовании в качестве ФС индоцианинового зеленого (4,5-бензоидотрикарбонцианин), поглощающего в ближней инфракрасной области спектра [19]. Показано, что фотосенсибилизатор при концентрации 200 мкг/мл существенно

не влияет на жизнеспособность сформированных биопленок. Другим примером антимикробной ФДТ биопленок культуры *Pseudomonas aeruginosa* штамма ATCC 9027 является использование в качестве ФС 0,01%-ного раствора метиленового синего в фосфатном буфере (максимум поглощения 670 нм), что приводит к снижению концентрации КОЕ/мл лишь на 2 порядка при дозе света 20,6 Дж/см² [25]. Наиболее значительный бактерицидный эффект был достигнут при использовании δ-аминолевулиновой кислоты. Полная фотодинамическая инактивация биопленок *Pseudomonas aeruginosa* была достигнута при концентрации ФС 20 мМ, дозе облучения 240 Дж/см² и двукратной обработке [15].

Способность фотосенсибилизаторов связываться с бактериями зависит от строения клеточной стенки бактерий, которая препятствует проникновению фотосенсибилизатора внутрь.

Изучение структурно-функциональных особенностей ФС показало, что незаряженные (нейтральные) молекулы ФС активно связываются с грамположительными бактериями и при воздействии света инактивируют их, однако их связывание с грамотрицательными бактериями и фотоинактивация последних недостаточно эффективны, тогда как катионные ФС обладают выраженным антибактериальным эффектом [4; 17; 18].

Настоящая статья посвящена результатам предварительных исследований нового катионного фотосенсибилизатора на основе метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил)-пурпуринимид для фотодинамической инактивации биопленок грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa*.

Материалы и методы

Получение субстанции ФС

При синтезе субстанции фотосенсибилизатора все реакции проводились в атмосфере аргона в дегазированных растворителях, при комнатной температуре и с защитой от света. Пурпурин 18 **1** был получен с использованием известной [14; 20] методики. Электронные спектры регистрировали с помощью спектрофотометра Jasco-UV 7800. Спектры ЯМР были зарегистрированы при 25 °С на спектрометре Bruker DPX 300. Масс-спектры получены на время-пролетном масс-спектрометре Bruker Ultraflex TOF/TOF методом MALDI с использованием 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (ДНВ) в качестве матрицы. Колоночную хроматографию проводили с использованием силикагеля 40/60 (Merck). Для препаративной тонкослойной хроматографии использовали пластины 20×20 см с толщиной слоя силикагеля 1 мм (Merck). Аналитическую ТСХ проводили на Kieselgel 60 F₂₄₅ (Merck).

N-Аминопурпуринимид **2** был получен согласно ранее [16] разработанному способу.

Предлагаемый ФС получают в несколько стадий в соответствии с рис. 1.

На первой стадии метиловый эфир N-аминопурпуринимид **2** получают за счет взаимодействия гидразингидрата с пурпурином 18 **1** и последующего метилирования продукта реакции с помощью diazometана.

Ранее нами было обнаружено, что в ходе этой реакции происходит восстановление винильной группы в положении 3 хлоринового макроцикла до этильной [19], что, по-видимому, связано с окислением гидразина в диимин, который и восстанавливает винильную группу [11].

В настоящей работе для сохранения винильной группы в предлагаемом ФС реакцию проводили в течение 30–40 мин в отсутствие кислорода [16]. Ход реакции контролировали спектрально по смещению основной полосы поглощения в область 706 нм.

На второй стадии метиловый эфир N-аминопурпуринимид **2** обрабатывают хлорангидридом никотиновой кислоты и кватернизируют пиридиновый атом азота в пурпуринимиде **3** иодметаном, что приводит к целевому соединению **4**.

Метиловый эфир 13³-N-никотинилпурпуринимид **3**
¹H ЯМР (600 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 9.48 (H, с, 10-H), 9.24 (H, с, 5-H), 9.18 (H, дд, C⁶-пиридин), 9.03 (H, дд, C⁵-пиридин), 8.91 (H, с, C²-пиридин), 8.52 (H, с, 20-H), 8.46 (H, с, 13³-NH), 7.90 (H, дд, J=18.0 Гц, 11.6 Гц, 3¹-H), 7.55 (H, м, C⁴-пиридин), 6.33 (H, д, J = 18.0 Гц, E-3²-H), 6.21 (H, д, J = 11.6 Гц, Z-3²-H), 5.26 (H, д, 17-H), 4.32 (H, м, 18-H), 3.73 (3H, с, 12-CH₃), 3.56 (3H, с, 17²-CH₃), 3.54 (3H, с, 2-CH₃), 3.48 (2H, к, 8¹-CH₂), 3.35 (3H, с, 7-CH₃), 2.78 (H, м, 17¹-CH₂^a), 2.35 (H, м, 17²-CH₂^a), 2.35 (H, м, 17³-CH₂^b), 2.59 (H, м, 17¹-CH₂^b), 1.71 (3H, д, 18-CH₃), 1.63 (3H, т, 8²-CH₃), 0.22 (H, NH), -0.31 (H, NH). UV-VIS (CHCl₃), λ_{max}, нм (относ. инт.): 365, 415 (Cope), 553 и 706 (1: 0.76: 0.44: 0.85). MS (MALDI), m/z: 675.372 [M]⁺(C₄₀H₃₉N₇O₅).

Метиловый эфир 13³-N-(N-метилникотинил)пурпуринимид **4**
 UV-VIS (CHCl₃), λ_{max}, нм (относ. инт.): 365, 415 (Cope), 553 и 706 (1: 0.76: 0.44: 0.85). MS (MALDI-TOF), m/z: 714,003 [M]⁺(C₄₁H₄₂N₇O₅), 577,892 [M- C₇H₈N₂O], (C₄₁H₄₂N₇O₅).

Получение водной дисперсии

метилового эфира

13³-N-(N-метилникотинил)пурпуринимид **4** с использованием Кремофора

Для изучения фотодинамической инактивации бактерий в составе биопленок с помощью катионного пурпуринимид **4** была приготовлена его водная дисперсия с использованием Кремофора ELP, который часто используется для солюбилизации слабо растворимых в воде ФС порфириновой природы и обладает дезагрегирующим действием [24].

Растворяли 5 мг метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил)пурпуринимид в 6 мл хлороформа. К 5 мл 4%-ного (масс.) раствора Кремофора в дистиллированной воде с температурой 41–43 °С при перемешивании и барботировании азота прибавляли вышеприготовленный раствор пурпуринимид в хлороформе порциями по 1 мл, добавляя каждую последующую порцию после полного испарения хлороформа из предыдущей. После добавления всего объема раствора субстанции в хлороформе и удаления остатков хлороформа током азота дисперсию охлаждали, доводили дистиллированной водой до первоначального объема и фильтровали через мембранный фильтр «Millipore» с размером пор 0,22 мкм.

Фотодинамическая

инактивация биопленок

Pseudomonas aeruginosa

с помощью катионного пурпуринимид **4**

В работе использовали клинический изолят *Pseudomonas aeruginosa* от больного мочекаменной болезнью. Бактерии культивировали в бульоне LB. Биопленки *Pseudomonas aeruginosa* выращивали в течение 18 ч при 37 °С на кольшках, погруженных в лунки 96-луночного планшета с бульонной культурой *Pseudomonas aeruginosa*, используя приспособление «Calgary Device» (фирма «Innovotech»: крышка для планшета с кольшками, которые опускаются в каждую лунку).

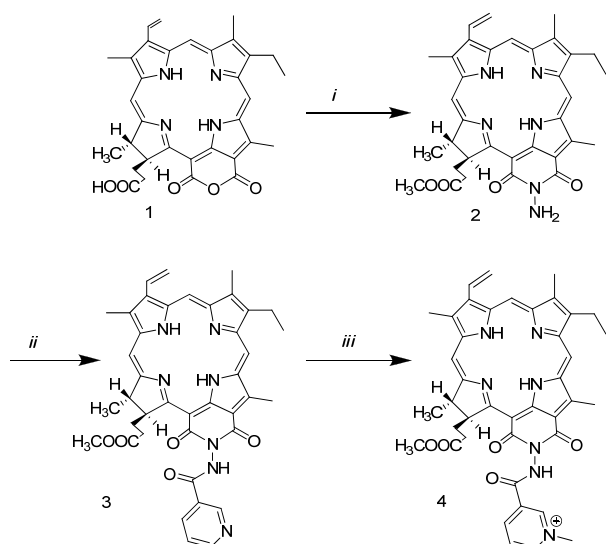


Рис. 1. Реагенты и условия: i, Py, N₂H₄, 0,5h, then H₂O/HCl 0,5h; CH₂N₂ 0,5h; ii, C₅H₄NCOCl, Py, 1h; iii, CH₃I, Δ, 2h.

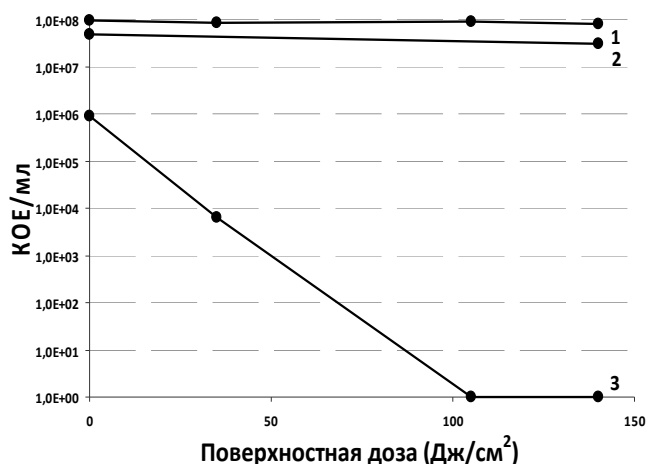


Рис. 2. Эффективность фотодинамической инактивации бактерий *Pseudomonas aeruginosa* 32 в составе биопленки в зависимости от дозы облучения ФС:

- 1 – культура + физиологический раствор;
- 2 – культура + кремофор ELP;
- 3 – культура + катионный порфуринимид 1мМ.

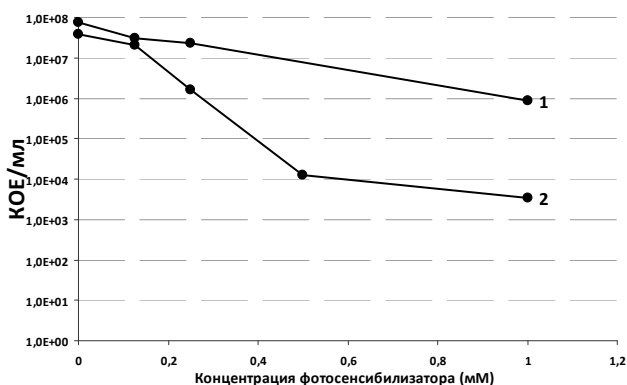


Рис. 3. Фотодинамическая инактивация катионным порфуринимидом бактерий *Ps. aeruginosa* 32 в составе биопленок в зависимости от концентрации ФС. Доза облучения 44 Дж/см².

- 1 – необлученный контроль;
- 2 – культура облучена дозой 44 Дж/см².

Выросшие биопленки отмывали от планктонных клеток, дважды опуская колышки в планшет с дистиллированной водой, и погружали в 1мМ раствор предлагаемого фотосенсибилизатора (кремофорная дисперсия метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил) порфуринимида).

После инкубации с фотосенсибилизатором в течение 60 минут крышку с колышками перенесли в планшет с физиологическим раствором и облучали лампой ЛФД-03-Биоспек с плотностью мощности излучения в спектральном диапазоне поглощения фотосенсибилизатора (680–730 нм) примерно 30 мВт/см². Изменение дозы облучения осуществлялось за счет времени облучения.

После облучения биопленки из каждой лунки разрушали методом соникации, режим которой был подобран таким образом, чтобы число вышедших из биопленки живых бактерий, было максимальным, и после серии десятикратных разведений

в физиологическом растворе из каждой лунки высеивали по 20 мкл на 6 секторов чашки Петри с питательным агаром для подсчета жизнеспособных бактерий. Число выросших колоний подсчитывали после 24 ч инкубации в термостате при 37 °С.

Число выросших колоний в данном разведении умножали на 50×10ⁿ, где n – номер разведения. Таким образом определяли количество живых бактерий в миллилитре (КОЕ/мл).

Визуализация бактерий *Ps. aeruginosa* 32 в составе биопленок до и после фотодинамического воздействия катионного порфуринимида

Окраска красителем «Live/Dead Biofilm Viability Kit» позволяет дифференцировать жизнеспособные и нежизнеспособные бактерии в биопленках. В комплект для окрашивания входят два флуоресцентных красителя SYTO[®]9 (компонент А) и пропидиум иодид (компонент В). Метод окрашивания основан на различной способности двух красителей проникать внутрь бактериальной клетки. SYTO[®]9 (3,34 мМ в DMSO) – зеленый флуоресцентный краситель, связывается с ДНК и окрашивает как живые, так и мертвые бактерии с неповрежденными и поврежденными клеточными мембранами, а пропидиум иодид (20 мМ в DMSO) – красный флуоресцентный краситель, красит мертвые бактерии с поврежденными клеточными мембранами.

Длины волны возбуждения для SYTO[®]9 и пропидиум иодида составляют 480 и 490 нм, а спектральные максимумы полос флуоресценции – соответственно 500 и 635 нм. Максимум флуоресценции катионного порфуринимида лежит в области 720 нм. При микроскопии использовали зеленый фильтр, который пропускает длины волн от 515 до 555 нм, и красный фильтр, который пропускает длины волн от 590 до 650 нм.

Такой выбор полос пропускания фильтров обеспечил возможность получения достоверной

информации в присутствии заметной флуоресценции катионного пурпуринимидов. Каждое поле зрения фотографировали через красный и зеленый фильтры, изображения совмещали с помощью программы, приложенной к микроскопу.

Культуру *Ps. aeruginosa* 32 выращивали в LB-бульоне в термостате с аэрацией при 37 °С 18 ч до стационарной фазы. Ночную культуру разводили в 100 раз LB-бульоном в объеме 10 мл и стерильно вносили по 1 мл в чашки Петри (Ø=35 мм) со стерильным покровным стеклом (18мм×18мм) на дне.

После инкубации из чашек Петри осторожно удаляли отсасыванием культуральную жидкость вместе с планктонными бактериями, вносили в чашки Петри по 300 мкл раствора фотосенсибилизатора, а для темновых контролей – 300 мкл физиологического раствора и 300 мкл раствора фотосенсибилизатора.

Инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин в темноте, затем отбирали растворы, чашки промывали физиологическим раствором три раза и вносили физиологический раствор в объеме 1 мл в чашки Петри.

Одну чашку, обработанную фотосенсибилизатором, облучали красным светом ксеноновой лампы со средней плотностью мощности 30±1 мВт/см² и плотностью световой дозы (за 20 мин облучения) D=36 Дж/см².

Флуоресцентные красители разводили в воде для инъекций из расчета 3 мкл SYTO[®]9 и 3 мкл пропидиум иодида на 1 мл воды. Из чашек Петри удаляли физиологический раствор и инкубировали биопленки на покровных стеклах в чашках с раствором «Live/Dead Biofilm Viability Kit» в течение 25 мин в темноте, после чего сразу же промывали три раза водой для инъекций и анализировали в микроскопе (флуоресцентный микроскоп Nikon H600L модель «Nikon Eclipse Ni» (Япония)) с флуоресцентным объективом 40×. Инструментальное увеличение составило 600×.

Результаты

Изучение зависимости эффективности фотодинамической инактивации от дозы облучения проводили при концентрации пурпуринимидов 4 в кремифорной дисперсии 1 мМ и времени инкубации 1 час (рис. 2).

Полная инактивация наблюдалась при плотности облучения $\phi=105$ Дж/см² (кривая 3). При длительном (60 мин) облучении в отсутствие фотодинамического агента гибель бактерий в биопленках не наблюдалась (кривая 1). Кремифор ELP также не вызывал гибели бактерий (кривая 2). Однако было обнаружено, что в биопленках, инкубированных с раствором фотосенсибилизатора в концентрации 1 мМ в течение 1 часа, наблюдалась частичная инактивация бактерий (на два порядка по сравнению с контролем без фотосенсибилизатора). Это предположительно, может быть связано с сондинамическим возбуждением фотосенсибилизатора при соникации, которая проводилась для разрушения биопленок при подсчете жизнеспособных колоний (аналогично тому, что наблюдалось для опухолевых клеток, см., например, [19]).

Литература

1. Белый Ю.А., Терещенко А.В., Плехотный М.А. Интравитреальная фотодинамическая терапия внутриглазного воспалительного процесса с препаратом фотодитазхин // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т.8, №2. – С. 28.

Изучалась также зависимость фотодинамической инактивации бактерий в биопленках от концентрации катионного пурпуринимидов (рис. 3).

Из рис. 2 следует, что инкубация бактерий *Ps. aeruginosa* 32 в составе биопленок в течение 1 часа с предлагаемым фотосенсибилизатором в концентрации 1 мМ и последующим облучением с поверхностной дозой $\phi=44$ Дж/см² на 4 порядка снижает жизнеспособность бактериальных клеток в составе биопленок по сравнению с контролем.

Визуализацию бактерий *Pseudomonas aeruginosa* 32 в составе биопленок до и после фотодинамического воздействия пурпуринимидов 4 проводили методом флуоресцентной микроскопии с использованием маркера «Live/Dead Biofilm Viability Kit», позволяющего дифференцировать жизнеспособные и нежизнеспособные бактерии в биопленках (рис. 4; см. вклейку).

На рис. 4 (А) в интактном контроле доминирует зеленое окрашивание.

Это свидетельствует о том, что большинство клеток в биопленке живые. Рис. 4 (В) иллюстрирует наличие единичных клеток красного окрашивания после инкубации с фотосенсибилизатором, что свидетельствует о незначительной темновой гибели клеток в составе сенсibilизированных биопленок.

На рис. 4 (С) наблюдается преобладание красного окрашивания, которое указывает на большое количество мертвых бактерий с поврежденными клеточными мембранами, что свидетельствует о фотодинамической инактивации бактерий *Ps. aeruginosa* 32 в составе биопленок.

Таким образом, данные микроскопического исследования, позволяющие наблюдать в препарате живые и мертвые клетки, подтверждают результаты, полученные при выявлении жизнеспособных клеток методом титрования опытных и контрольных культур, демонстрируя эффективное взаимодействие предлагаемого фотосенсибилизатора с биопленкой, вызывающее гибель содержащихся в ней бактерий.

Заключение

Проведенные исследования показали, что предлагаемый катионный фотосенсибилизатор на основе метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил)-пурпуринимидов обладает высокой антибактериальной эффективностью против грамотрицательных бактерий *Ps. aeruginosa* в составе биопленок. Дополнительным преимуществом предлагаемого фотосенсибилизатора является тот факт, что его спектральная полоса поглощения имеет максимум в диапазоне 706 нм, в котором собственное поглощение биологических тканей невелико.

Это позволит эффективно осуществлять лечение очагов инфекции с глубокой инфильтрацией в ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 13-03-00577 и 14-03-31935) и Гранта Президента РФ по поддержке ведущих научных школ НШ-2038.14.7.

2. *Гладышев А.А., Телегина Л.В., Соколов В.В. и др.* Эндолорингиальная электро-лазерная хирургия и ФДТ при вирусассоциированном рецидивирующем папилломатозе гортани и трахеи // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т.8, №2. – С. 323.
3. *Лагун Л.В., Жаворонок С.В.* Бактериальные биопленки и их роль в развитии инфекции мочевыводящих путей // Медицинский журнал БГМУ. – 2013. – №4. – С. 21–7.
4. *Лукьянец Е.А., Ворожцов Г.Н., Калия О.Л. и др.* Патент РФ № 2282647, приоритет от 31.05.2005, опубл. 27.08.2006.
5. *Меерович И.Г., Оборотова Н.А.* Применение липосом в фотохимиотерапии: 1. Липосомы в ФДТ // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т.3, № 4. – С. 3–8.
6. *Меерович И.Г., Оборотова Н.А.* Применение липосом в фотохимиотерапии: 2. Липосомальные формы для создания фотоактивируемых липосомальных препаратов в фотобиологических исследованиях // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 6–12.
7. *Романова Ю.М., Толордава Э.Р., Диденко Л.В., Гинцбург А.Л.* Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития // ВРАМН. – 2011. – №10. – С. 31–9.
8. *Соловьева А.Б., Толстых П.И., Сорокатый Н.Н. и др.* ФДТ обширных гнойных ран и ожогов с комплексами амфифильных полимер-порфиринов, иммобилизованными на наночастицах гидроксипатита // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 1. – С. 81.
9. *Странадко Е.Ф.* Основные этапы развития и современное состояние ФДТ в России // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 51.
10. *Странадко Е.Ф., Коробов В.М., Толстых М.П.* Фотодинамическая терапия при гнойных заболеваниях мягких тканей // Хирургия. – 2000. – Т. 9. – С. 67–70.
11. *Furst A., Berlo R.S., Hooton S.* Hydrazine as a reducing agent for organic compounds // Chem. Rev. – 1965. – 65. – P. 51.
12. *Hamblin M.R., Hasan T.* Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? // Photochem. Photobiol. Sci. – 2004. – 3. – P. 436–50.
13. *Jori G., Brown S.B.* Photosensitized inactivation of microorganisms // Photochem. Photobiol. Sci. – 2004. – 3. – P. 403–5.
14. *Lee S.-J. H., Jagerovic N., Smith K.M.* Use of the chlorophyll derivative, purpurin-18 for syntheses of sensitizers for use in photodynamic therapy // J. Chem. Soc., Perkin Trans 1. – 1993. – P. 2369–77.
15. *Lee C.F., Lee C.J., Chen C.T., Huang C.T.* Delta-aminolaevulinic acid mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Pseudomonas aeruginosa* planktonic and biofilm cultures // J. Photochem. Photobiol. B. – 2004. – 75. – P. 21–5.
16. *Li J.Z., Li L., Kim J.H. et al.* Synthesis of Chlorophyllous Chlorin Derivatives Possessing Stereo-isomeric Character // J. Porphyrins Phthalocyanines. – 2011. – 15. – С. 264–70.
17. *Malik Z., Ladan H., Nitzan Y.* Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions // J. Photochem. Photobiol. – 1992. – 14. – P. 262–6.
18. *Minnock A., Vernon D.I., Schofield J. et al.* Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both gram-negative and gram-positive bacteria // J. Photochem. Photobiol. – 1996. – 32. – P. 159–64.
19. *Mironov A.F., Grin M.A., Nochovny S.A., Toukach F.V.* Novel cycloimides in the chlorophyll *a* series // Mendeleev Commun. – 2003. – 4. – P. 156–8.
20. *Mironov A.F., Kozyrev A.N., Brandis A.S.* Sensitizers of second generation for photodynamic therapy of cancer based on chlorophyll and bacteriochlorophyll derivatives // Proc. SPIE. – 1993. – 1922. – P. 204–8.
21. *Omar Gh.S.M.* Killing of organisms responsible for wound infections using a light-activated antimicrobial agent / For the degree of Doctor of Philosophy in the Faculty of Medicine University College London. – 2010. – P. 329.
22. *Pace J.L., Rupp M.E., Finch R.G.* Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy // CRC Press Taylor&Francis Group. – 2005. – 7. – P. 109–53.
23. *Rossolini G., Mantegoni E.* Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* // Clin Microbiol Infect. – 2005. – 11. – P. 17–32.
24. *Sharonov G.V., Karmakova T.A., Kassies R. et al.* Cycloimide bacteriochlorin derivatives: photodynamic properties, cellular- and tissue distribution // Free radicals in biology and medicine. – 2006. – 40. – P. 407–419.
25. *Street C.N., Gibbs A., Pedigo L. et al.* In vitro photodynamic eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in planktonic and biofilm culture // Photochemistry and Photobiology. – 2009. – 85. – P. 137–43.
26. *Wainwright M.* Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) // J. Antimicrob. Chemother. – 1998. – 42. – P. 13–28.
27. *Wakako Hiraoka, Hidemi Honda et al.* Comparison between sonodynamic effect and photodynamic effect with photosensitizers on free radical formation and cell killing // Ultrasonic Sonochemistry. – 2006. – 13. – P. 535–42.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>К.И. Бражник, З.А. Соколова, М.А. Барышникова, Р.С. Билан, И.Р. Набиев, А.В. Суханова</i> РАЗРАБОТКА СУСПЕНЗИОННЫХ МИКРОЧИПОВ НА ОСНОВЕ МИКРОСФЕР, КОДИРОВАННЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ НАНОКРИСТАЛЛАМИ, И ПРИНЦИПЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ МНОГОПАРАМЕТРИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	3
<i>Р.С. Билан, К.И. Бражник, П.П. Шамс, Д. Бати, И.Р. Набиев, А.В. Суханова</i> ОРИЕНТИРОВАННЫЕ КОНЬЮГАТЫ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ И ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОКРИСТАЛЛОВ: НОВОЕ ПОКОЛЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ НАНОМЕТОК ДЛЯ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЙ ДЕТЕКЦИИ ОНКОМАРКЕРОВ	11
<i>О.О. Рябая, Т.А. Сидорова, А.Н. Иншаков, Э.Ш. Соломко, Е.В. Степанова</i> МОДУЛЯЦИЯ АУТОФАГИИ ВЛИЯЕТ НА ПИТОТОКСИЧНОСТЬ ПАКЛИТАКСЕЛА НА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА <i>IN VITRO</i>	17
<i>Т.В. Ахлынина, А.В. Мисюрин, Н.А. Лыжко, Ю.П. Финашутина, В.А. Мисюрин, Е.В. Аксенова, И.Н. Солдатова, А.П. Шпакова, Б.Б. Хасигова, Т.И. Булычева, О.С. Бурова</i> НАЛИЧИЕ ИММУНОГЕННОГО АНТИГЕНА В ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТКЕ СПОСОБСТВУЕТ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОМУ ДЕЙСТВИЮ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК	23
<i>И.С. Брюховецкий, А.С. Брюховецкий, П.В. Мищенко, Е.В. Толок, Р.Ю. Хотимченко</i> МИГРАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА К КЛЕТКАМ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЛИНИИ U87 <i>IN VITRO</i>	31
<i>А.И. Лебедева</i> АЛЛОГЕННЫЙ ГУБЧАТЫЙ БИОМАТЕРИАЛ – ИНГИБИТОР ФИБРОЗА ПОВРЕЖДЕННОЙ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ	37
<i>И.В. Уласов, Н.В. Каверина, А.Ю. Барышников</i> ИНФЕКЦИЯ КЛЕТОК ГЛИОМ ОНКОЛИТИЧЕСКИМ ВИРУСОМ СЕНСИБИЛИРУЕТ ИХ К ТЕРАПИИ ТЕМОЗОЛОМИДОМ	45
<i>И.С. Брюховецкий</i> ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЭКСПЕРИМЕНТЕ <i>IN VIVO</i> ПОСЛЕ КУРСА ХИМИОТЕРАПИИ НА МОДЕЛИ ГЛИОБЛАСТОМЫ У КРЫС	51
<i>С.С. Брусов, Ю.С. Колоскова, М.А. Грин, И.Г. Тиганова, О.Е. Пагина, Э.Р. Толордава, Т.В. Степанова, Г.А. Меегрович, Ю.М. Романова, А.Ф. Миронов</i> НОВЫЙ КАТИОННЫЙ ПУРПУРИНИМИД ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ БИОПЛЕНОК <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	59
<i>Р.И. Якубовская, А.Д. Плютинская, Е.А. Лукьянец</i> СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ В СИСТЕМЕ <i>IN VITRO</i>. ФТАЛОЦИАНИНЫ	65
<i>А.О. Райков, А.А. Матюшин, И.И. Краснюк</i> ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ МИТОКСАНТРОНА	73
ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ	
<i>И.Н. Григорьева, И.В. Манина, Н.В. Голубцова, А.В. Караулов</i> ТРУДНОСТИ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ АТОПИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ И ВОЗМОЖНЫЕ ПОДХОДЫ К ИХ РЕШЕНИЮ	79
<i>П.В. Гольшико</i> МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ АНТИАНГИОГЕННОЙ ТЕРАПИИ	83
Содержание журналов за 2014 год.....	22; 50; 58; 64
<i>К 60-летию Жумагазина Жанабая Дербесеновича</i>	93

УДК 615.832.3:616-006-018.08:615.277.3

Р.И. Якубовская¹, А.Д. Плютинская¹, Е.А. Лукьянец²**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ В СИСТЕМЕ IN VITRO. ФТАЛОЦИАНИНЫ**¹ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» Минздрава РФ, Москва;²ФГУП Государственный научный центр «НИОПИК», Москва**Контактная информация**

Плютинская Анна Дмитриевна, к.б.н, научный сотрудник отделения модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии ФГБУ «МНИОИ им. П.А.Герцена» МЗ РФ

адрес: 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, д.3, тел. +7(495)945-87-16

e-mail: anna2031@rambler.ru

Статья поступила 10.11.2014, принята к печати 24.11.2014.

Резюме

В работе проведено изучение физико-химических свойств и фотоиндуцированной эффективности отрицательно и положительно заряженных фталоцианинов в системе *in vitro*. Показано, что все исследованные фталоцианины характеризовались устойчивостью в биосовместимых средах, как без облучения, так и при воздействии светом. Наибольшую фотоиндуцированную активность относительно опухолевых клеток среди отрицательно заряженных фталоцианинов проявили цинковое, магниевое и безметальное производные со средней степенью сульфирования 2,5 в отношении клеток культуры HEp2 (ИК₅₀ в среднем составляла 0,2±0,08 мкМ). На основе сульфированного безметального производного фталоцианина разработан препарат «Фталосенс-лио». Среди положительно заряженных фталоцианинов наибольшей эффективностью обладал цинковый комплекс с холиновым заместителем (ИК₅₀ варьировалась в зависимости от культур опухолевых клеток HT29, T24, A549 и HEp2 от 2,00±0,13 мкМ до 0,30±0,08 мкМ). На основе данного фотосенсибилизатора разработан препарат «Холосенс-лио».

Ключевые слова: фотодинамическое воздействие *in vitro*, фталоцианины, опухолевые клетки.R.I. Yakubovskaya¹, A.D. Plyutinskaya¹, E.A. Lukyanets²**COMPARATIVE IN VITRO STUDY OF DIFFERENT CLASSES OF PHOTOSENSITIZERS. PHTHALOCYANINES**¹P.A. Hertsen Moscow Research Institute of Oncology, Moscow²Organic Intermediates and Dyes Institute, Moscow**Abstract**

Photochemical properties and photoinduced *in vitro* efficacy of the range of negatively and positively charged phthalocyanines are represented in the study. It was shown that the studied derivatives of phthalocyanines are stable in biocompatible media without irradiation and when exposed to a light excitation. Among the negatively charged compounds the most pronounced photoinduced cytotoxic activity on human carcinoma cells was revealed for zinc, magnesium containing phthalocyanines and for metal-free derivatives with an average degree of sulfonation of 2.5 (average IC₅₀ value for HEp2 human carcinoma cells was 0,2±0,08 microM). Zinc containing choline-substituted derivative was the most phototoxic among the positively charged phthalocyanines. The IC₅₀ value varied from 2,00 ± 0,13 microM to 0,30 ± 0,08 microM on various human tumor cell lines (HT29, T24, A549 and Hep2 cells). Preparation "Phthalosens Lio" based on the sulfonated metal-free phthalocyanine derivative and preparation "Holosens Lio" based on the zinc containing choline-substituted derivative were developed.

Key words: photodynamic effects *in vitro*, phthalocyanines, the tumor cells.**Введение**

ФДТ – перспективное направление лечения злокачественных новообразований, основанное на разрушении структурных элементов опухоли активными формами кислорода и свободными радикалами, которые образуются при взаимодействии накопившегося в опухолевом узле фотосенсибилизатора со светом определенной длины волны [10; 16; 19; 20; 40].

В онкологии ФДТ применяется для лечения опухолевого поражения кожи, полости рта, пищевода, желудка, шейки матки и других локализаций [1; 18; 28; 31; 39]. Как за рубежом, так и в России создан целый ряд препаратов-ФС для применения в клинической практике, характеризующихся высокой противоопухолевой эффективностью («Фото-

фрин» (США), «Фотогем» (Россия), «Фотосенс» (Россия), «Радахлорин» (Россия), «Фотолон» (Беларусь), «Фотодитазин» (Россия), «Фоскан» (Великобритания)). Кроме того, в последние годы ведутся обширные исследования по разработке наноструктурированных лекарственных форм фотосенсибилизаторов, например, Фотодитазина, Фотосенса, Тиосенса Борхлорина и др., применение которых позволяет повысить биодоступность сенсибилизирующих агентов и эффективность лечения за счет изменения фармакокинетики препарата [3–9; 11; 13; 14; 17; 22; 24; 25]. Однако большинство из указанных препаратов имеют спектр фотодинамического воздействия с максимумами в области 620–680 нм, что недостаточно для полной деструкции опухолевого очага. Создание и внедрение новых ФС, поглощающих в красной и ближней ИК облас-

тях спектра, является на сегодняшний день приоритетной задачей [15; 26]. Одним из направлений при разработке ФС является химическая модификация природных хлоринов и бактериохлоринов [2], но наряду с природными объектами исследуется большое число полностью синтетических порфиринов и их структурных аналогов [21; 30; 35].

Производные Рс являются перспективными соединениями для применения их при ФДТ. Данный класс ФС имеет ряд значительных преимуществ: наличие интенсивного поглощения (коэффициент экстинкции – $1,0\text{--}1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) в красной области спектра (670–700 нм), возможность введения заместителей в бензольные кольца макроцикла, а также его модификация позволяют широко варьировать физико-химические свойства Рс. Их светоустойчивость, а также достаточно высокий квантовый выход генерации синглетного кислорода (0,3–0,5) дают возможность применять их при облучении малыми дозами света [27; 34].

К настоящему времени синтезировано и исследовано большое количество производных Рс с различными заместителями (алкокси-, арилокси-, сульфо-, карбоксигруппами и др.), с различными центральными атомами металла (Al, Zn, Si и др.) или безметалльные соединения, которые характеризуются высокой фотоиндуцированной активностью относительно опухолевых клеток [12; 29; 33; 38].

Положительно заряженные производные Рс оказались эффективными агентами для фотодинамической инактивации бактерий, отрицательно заряженная оболочка которых препятствует проникновению анионных ФС. АФДТ открывает широкие перспективы в лечении инфекционно-воспалительных заболеваний, особенно при развитии высокой резистентности микроорганизмов к антибиотикам [23; 32; 36].

В своих исследованиях мы провели сравнительное изучение ФС различных классов (Рс, синтетические бактериохлорины, производные природного хлорофилла *a* и бактериохлорофилла *a*), оценили их физико-химические, фотофизические и биологические свойства в зависимости от структуры.

В данной статье представлены результаты исследования анионных и катионных производных Рс в системе *in vitro* с различными координационными атомами металла и заместителями в бензольных кольцах макроцикла. Изучены их физико-химические свойства, оценена фотоиндуцированная цитотоксичность относительно опухолевых клеток человека различного эпителиального происхождения *in vitro*.

Материалы и методы

Производные Рс

Синтезированы в ФГУП ГНЦ «НИОПИК» (проф. Е.А. Лукьянец). Для растворения ФС использовали 0,9 %-ный раствор NaCl. Диапазон концентраций ФС варьировали для физико-химических исследований от 0,5 до 40 мкМ, для биологических исследований – от 20 до 300 мкМ.

Для изучения биологической (противоопухолевой) активности ФС были отобраны соединения, хорошо растворимые в биосовместимых средах и характеризующиеся устойчивостью в бесклеточной среде в течение 24 ч.

Исследования *in vitro*

В работе использованы клеточные линии человека (ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Иванковского МЗ РФ): A549 (карцинома легкого), HEr2

(эпидермоидная карцинома гортаноглотки), HT29 (карцинома толстой кишки), Raji (лимфома Беркитта), T24 (карцинома мочевого пузыря). В работе использовали клеточные линии от 3 до 18 пассажей.

Клетки рассеивали в 96-луночные культуральные планшеты, инкубировали в течение 28 ч при +37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5 % CO₂ (стандартные условия).

Посевная концентрация клеток устанавливалась для каждой культуры с таким расчетом, чтобы воздействие проходило в экспоненциальной (логарифмической) фазе роста клеток. Далее в планшеты вносили ФС в различных концентрациях (при двух- или трехкратных последовательных разведениях в дуплетах) и проводили облучение галогеновой лампой с набором фильтров, режим облучения – непрерывный. Затем клетки инкубировали в стандартных условиях 24–28 ч.

Оценку выживаемости клеток проводили с использованием МТТ-теста [37]. Уровень ингибирования роста клеток вычисляют по формуле:

$$IP(\%) = \left[\frac{OD_k - OD_0}{OD_k} \right] \times 100\%, \text{ где}$$

IP – уровень ингибирования роста клеток в культуре; OD₀ и OD_k – оптическая плотность раствора формазана в опытных и контрольных лунках соответственно.

Для расчета величины ИК₅₀ строили кривую роста зависимости ингибирования пролиферации клеточной культуры от концентрации ФС, по которой находили его концентрацию, соответствующую 50 % гибели клеток.

Результаты и обсуждения

В настоящей работе проведено сравнительное изучение в оптимальных условиях Рс с различными анионными и катионными боковыми заместителями и центральными атомами металла.

Это соединения порфиринового ряда, у которых четыре мезо-углеродных мостика в макроцикле замещены на атомы азота. Для этих соединений характерно наличие интенсивного поглощения в красной и ближней ИК-областях.

Незамещенные Рс – гидрофобные соединения, однако их структурная модификация введением гидрофильных заместителей, позволяет достичь необходимой растворимости в воде, улучшить их фотофизические свойства, а также, в ряде случаев, улучшить доставку в клетку.

Отрицательно заряженные Рс

В работе изучены отрицательно заряженные карбокси- и сульфопроизводные Рс разной степени замещения и с различными центральными атомами металла (Al, Zn, Mg) (табл. 1).

Стабильность красителей в динамике

При изучении спектров поглощения производных Рс было отмечено, что металлосодержащие производные находятся в водно-солевых растворах в частично агрегированной, а безметалльные – в полностью агрегированной форме.

Однако присутствие гидрофобного компонента (Кремофора) в среде способствовало их мономеризации, сопровождающейся батохромным сдвигом максимума поглощения и увеличением оптической плотности.

Таблица 1

Отрицательно заряженные Pс

№	R	M	Формула	λ_{\max} , нм	
				(1% водный р-р Кремофора)	
1	-COOH	Zn	ZnPc(COOH) ₈	690	690
2	-COOH	Al	AlPc(COOH) ₈	690	690
3	-SO _{-1,5}	HH	H ₂ Pc(SO ₃) _{1,5}	690	690
4	-SO _{-2,5}	HH	H ₂ Pc(SO ₃) _{2,5}	690	690
5	-SO _{-2,5}	Mg	MgPc(SO ₃) _{2,5}	680	680
6	-SO _{-2,5}	Zn	ZnPc(SO ₃) _{2,5}	673	673
7	-SO ₋₃	HH	H ₂ Pc(SO ₃) ₃	690	690
8	-SO ₋₃	Mg	MgPc(SO ₃) ₃	680	680
9	-SO ₋₃	Zn	ZnPc(SO ₃) ₃	673	673
10	-SO _{-3,8}	HH	H ₂ Pc(SO ₃) _{3,8}	690	690
11	-SO _{-3,8}	Mg	MgPc(SO ₃) _{3,8}	680	680
12	-SO _{-3,8}	Zn	ZnPc(SO ₃) _{3,8}	673	673

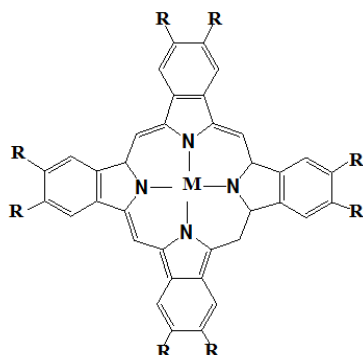


Таблица 2

Стабильность производных Pс в различных растворителях (абсорбционный анализ). Концентрация растворов 10 мкМ

№	ФС	Время инкубации, часы					
		Ex tempore		2		24	
		λ_{\max} , нм	OD, усл. ед.	λ_{\max} , нм	OD, усл. ед.	λ_{\max} , нм	OD, усл. ед.
среда Игла с 7% ЭТС							
1	ZnPc(COOH) ₈	690	0,91±0,04	692	0,9±0,03	692	0,79±0,04
2	AlPc(COOH) ₈	690	0,62±0,03	690	0,55±0,03	690	0,32±0,02
4	H ₂ Pc(SO ₃) _{-2,5}	620	0,42±0,02	620	0,4±0,02	620	0,43±0,03
5	MgPc(SO ₃) _{-2,5}	663	0,47±0,03	673	0,47±0,02	675	0,48±0,02
6	ZnPc(SO ₃) _{-2,5}	663	0,47±0,02	673	0,46±0,01	675	0,48±0,01
1% водный раствор Кремофора							
1	ZnPc(COOH) ₈	690	0,95±0,04	690	0,95±0,02	690	0,8±0,01
2	AlPc(COOH) ₈	690	0,68±0,02	690	0,69±0,02	690	0,52±0,02
4	H ₂ Pc(SO ₃) _{-2,5}	662	0,91±0,02	662	0,9±0,02	662	0,89±0,02
		693	0,97±0,01	693	0,97±0,03	693	0,98±0,02
5	MgPc(SO ₃) _{-2,5}	680	0,71±0,02	680	0,72±0,03	680	0,73±0,03
6	ZnPc(SO ₃) _{-2,5}	673	0,86±0,03	673	0,86±0,01	673	0,88±0,04

Таблица 3

Положительно заряженные Pс

№	R	M	Формула	λ_{\max} , нм среда Игла
13	-CH ₂ N ⁺ Me ₂ CH ₂ CH ₂ OH Cl ⁻	Zn	ZnPcChol ₈	685
14	-CH ₂ N ⁺ Me ₂ CH ₂ CH ₂ OH Cl ⁻	AlOH	AlPcChol ₈	685
15	-CH ₂ N ⁺ Me ₂ CH ₂ CH ₂ OH Cl ⁻	HH	H ₂ PcChol ₈	685
16	-CH ₂ N ⁺ Cl ⁻	Zn	ZnPcPym ₈	685
17	-CH ₂ N ⁺ Cl ⁻	AlOH	AlPcPym ₈	685

Таблица 4

Стабильность положительно заряженных Pс в культуральной среде с содержанием 7% ЭТС

№	Формула	λ_{\max} погл., нм	Время инкубации, часы		
			Ex tempore	2	24
			OD, усл. ед.		
13	ZnPcChol ₈ *	685	0,89±0,02	0,82±0,01	0,78±0,02
14	AlPcChol ₈ *	685	0,87±0,01	0,8±0,02	0,72±0,01
15	H ₂ PcChol ₈ *	685	0,25±0,03	0,15±0,02	0,09±0,01
16	ZnPcPym ₈ *	685	0,88±0,02	0,86±0,03	0,77±0,03
17	AlPcPym ₈ *	685	0,51±0,02	0,5±0,02	0,32±0,02
№	Формула	λ_{\max} флуор., нм	IF×10 ³ , усл. ед.		
13	ZnPcChol ₈ *	695	254±6,8	234±6	104±1,1
14	AlPcChol ₈ *	695	293±8,1	100±2,5	72±8
15	H ₂ PcChol ₈ *	695	10±3	8±3	6±0,8
16	ZnPcPym ₈ *	695	198±5,1	182±3,7	94±3,1
17	AlPcPym ₈ *	695	200±3,9	125±4,2	50±1,7

Таблица 5

Величина ИК₅₀ положительно заряженных Рс в зависимости от времени инкубации до облучения. Культура клеток Нер2

№	Формула	Время инкубации до воздействия, часы				
		0,5	1	2	4	6
13	ZnPcChol ₈	1,2±0,2	0,72±0,11	0,29±0,11	0,31±0,12	0,33±0,10
14	AlPcChol ₈	25±0,2	20,0±2,0	15,0±0,15	16,0±0,4	15,0±0,3
16	ZnPcPym ₈	1,6±0,3	0,81±0,20	0,33±0,13	0,32±0,11	0,33±0,12
17	AlPcPym ₈	35±1,5	33,0±0,9	27,0±0,2	26,0±1,2	26,0±1,5

Производные октакарбоксо-Рс алюминия и цинка **1, 2** характеризовались меньшей стабильностью в динамике (снижение оптической плотности в течение суток в 1,2–2 раза), что вероятно связано с их агрегацией в растворах.

Анализ спектров сульфопроизводных безметалльного Рс в зависимости от степени замещения (n=1.5; 3.0 и 3.8) в среде Игла, содержащей 7 % ЭТС, и в 1 %-ном водном растворе Кремофора, показал, что все они характеризуются стабильностью в выбранном временном диапазоне (табл. 2).

Оценка фотовыцветания отрицательно заряженных производных Рс в среде Игла, содержащей 7% ЭТС, в зависимости от световой дозы показала, что сульфированные производные (**3–12**) более светоустойчивы, чем октакарбоксо-Рс (**1; 2**).

Фотоиндуцированная активность отрицательно заряженных Рс

В биологических тестах *in vitro* установлено, что ФС в диапазоне концентраций от 0,05 до 2 мкМ не обладают темновой цитотоксичностью относительно опухолевых клеток. Фотоактивность октакарбоксо-Рс алюминия и цинка Рс (**1, 2**) относительно клеток Нер2 оказалась существенно ниже, чем сульфопроизводных **3–12** (ИК₅₀ **2** – 200±1,5 мкМ, **1** – 160±2,1 мкМ). Наибольшую активность проявили комплексы цинка, магния и свободное основание с двумя и тремя сульфогруппами (ИК₅₀ в среднем составляла 0,2±0,1 мкМ). Фотоиндуцированная активность соединений возрастала в ряду: «Фотосенс» < Zn, Mg, H₂Pc(SO₃)_{3,8} < Zn, Mg, H₂Pc(SO₃)₃ ≤ H₂Pc(SO₃)_{1,5} < Zn, Mg, H₂Pc(SO₃)_{2,5} (ИК₅₀ составляла 2,5±0,7, 1,8±0,3, 0,6±0,2 и 0,55±0,08, 0,19±0,04 мкМ соответственно; рис. 1).

Отмечено, что при варьировании времени инкубации до воздействия от 30 минут до 6 часов все ФС проявляли максимальную фотоиндуцированную активность при 2-часовой инкубации. При увеличении времени инкубации до 6 часов величина ИК₅₀ изменялась незначительно.

Таким образом, красители быстро проникали в клетки и накапливались в них. На примере безметалльного и магниевого производных (**4, 5**) Рс на рис. 2 представлены зависимости ингибирования пролиферации опухолевых клеток от времени инкубации при ФДВ.

Для оценки роли центрального атома металла производных Рс при ФДВ *in vitro* (культура клеток Нер2) проведено изучение безметалльного Рс (H₂Pc(SO₃)_{~2,5}; **4**), магниевого и цинкового комплексов (MgPc(SO₃)_{~2,5} (**5**) и ZnPc(SO₃)_{~2,5} (**6**), соответственно. Показано, что эффективность данных соединений была сопоставима, причем оказалась значительно выше, чем у «Фотосенса» (рис. 3).

Косвенная оценка внутриклеточного накопления ФС при световом воздействии в присутствии соединений в среде во время облучения и с их удалением непосредственно перед облучением показала, что ФС быстро проникают в клетки и накапливаются в них (фотоиндуцированная активность ФС

относительно клеток Нер2 не снижалась при их удалении из среды; рис. 4).

Для углубленного изучения в системе *in vitro* отобран образец безметалльного Рс со степенью сульфирования 2,5 (H₂Pc(SO₃)_{~2,5}), который характеризовался максимальной активностью. На опухолевых клетках человека – аденокарциноме легкого (A549), карциноме мочевого пузыря (T24) и карциноме толстой кишки (HT29), а также лимфоме Беркитта (Raji) – проведено сравнительное изучение его активности. Показано, что наиболее чувствительными оказались клетки культуры Raji (ИК₅₀ – 0,04±0,07 мкМ), менее чувствительной – A549 (ИК₅₀ – 0,52±0,11 мкМ), самыми устойчивыми оказались клетки культур T24 и HT29 (ИК₅₀ 1,8±0,1 мкМ и 3,2±0,08 мкМ соответственно).

Положительно заряженные Рс

Положительно заряженные Рс рассматриваются как потенциальные агенты не только для ФДТ рака, но и для антимикробной ФДТ. Изучены катионные производные Рс, отличающиеся центральными атомами металла и несущими заряд заместителями – остатками солей четвертичных аммониевых оснований (табл. 3).

Стабильность красителей в динамике

Анализ полученных данных показал, что из всех изученных соединений безметалльное холиновое производное Рс H₂PcChol₈ (**15**) характеризовалось наименьшей устойчивостью в среде Игла с добавлением 7% ЭТС, поэтому в дальнейших экспериментах его не использовали.

Соединения **13; 14; 16** и **17** характеризовались стабильностью в динамике (табл. 4).

При оценке фотовыцветания ФС в культуральной среде выявлено, что все соединения характеризовались устойчивостью при световом воздействии.

Фотоиндуцированная активность катионных производных Рс на опухолевых клетках в культуре

В ряду холиновых и пиридиниевых производных наибольшей фотоиндуцированной противоопухолевой активностью обладали цинковые комплексы, а меньшей активностью – алюминиевые комплексы (рис. 3).

Максимальная эффективность ФС при ФДВ выявлена при 2 часах инкубации, увеличение временного интервала до 6 часов не приводило к изменению величины ИК₅₀ (табл. 5).

Для наиболее активных ФС **13** и **16** показано, что они эффективно проникают в опухолевые клетки и накапливаются в них.

Так, проведение облучения непосредственно после удаления ФС из среды инкубации не приводило к изменению фотоиндуцированной цитотоксичности данных ФС (ИК₅₀ при облучении в присутствии красителей составляла 0,29±0,07 мкМ и 0,30±0,11 мкМ, а при их удалении – 0,32±0,08 мкМ и 0,29±0,10 мкМ соответственно).

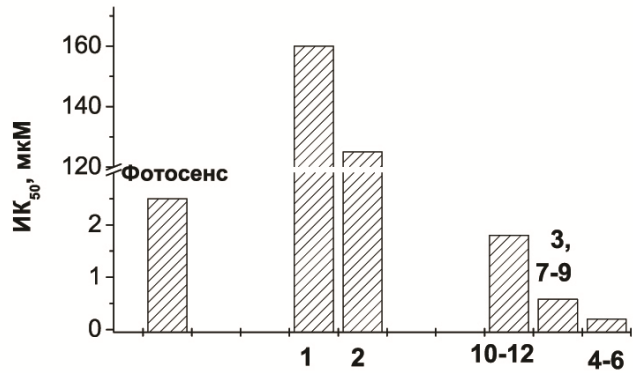


Рис. 1. Величина IC_{50} производных Pс: $ZnPc(COOH)_8$ (1), $H^0Pc(SO_3)_3$ (7), $AlPc(COOH)_8$ (2), $MgPc(SO_3)_3$ (8), $H^2Pc(SO_3)_{1,5}$ (3), $ZnPc(SO_3)_3$ (9), $H^2Pc(SO_3)^{2,5}$ (4), $H^2Pc(SO_3)^{3,8}$ (10), $MgPc(SO_3)^{2,5}$ (5), $MgPc(SO_3)^{3,8}$ (11), $ZnPc(SO_3)^{2,5}$ (6), $ZnPc(SO_3)^{3,8}$ (12).
Время инкубации 2 часа.
Культура клеток HEp2

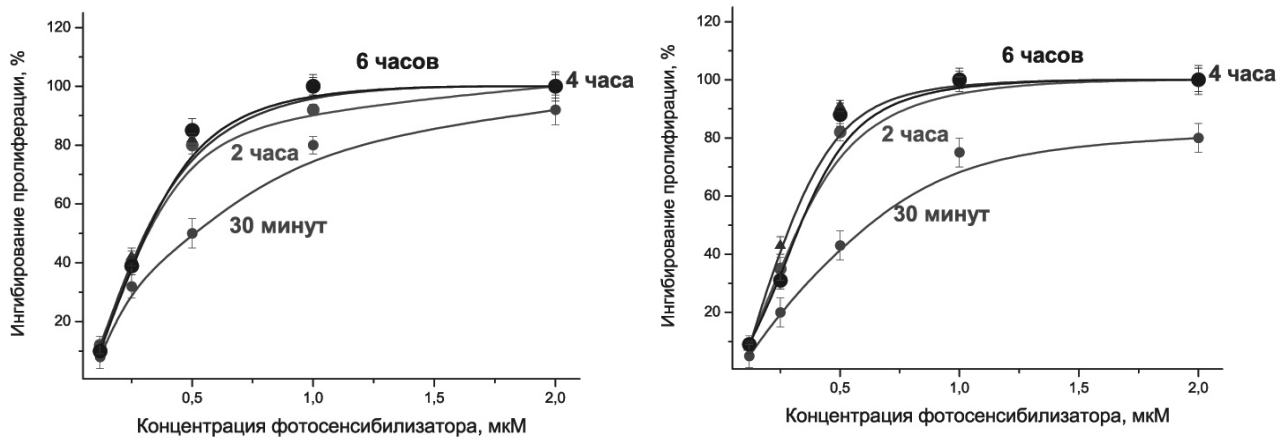


Рис. 2. Ингибирование пролиферации опухолевых клеток (HEp2) при ФДВ с $H_2Pc(SO_3)_{\sim 2,5}$ (4, 1) и $MgPc(SO_3)_{\sim 2,5}$ (5, 2) в зависимости от времени инкубации.

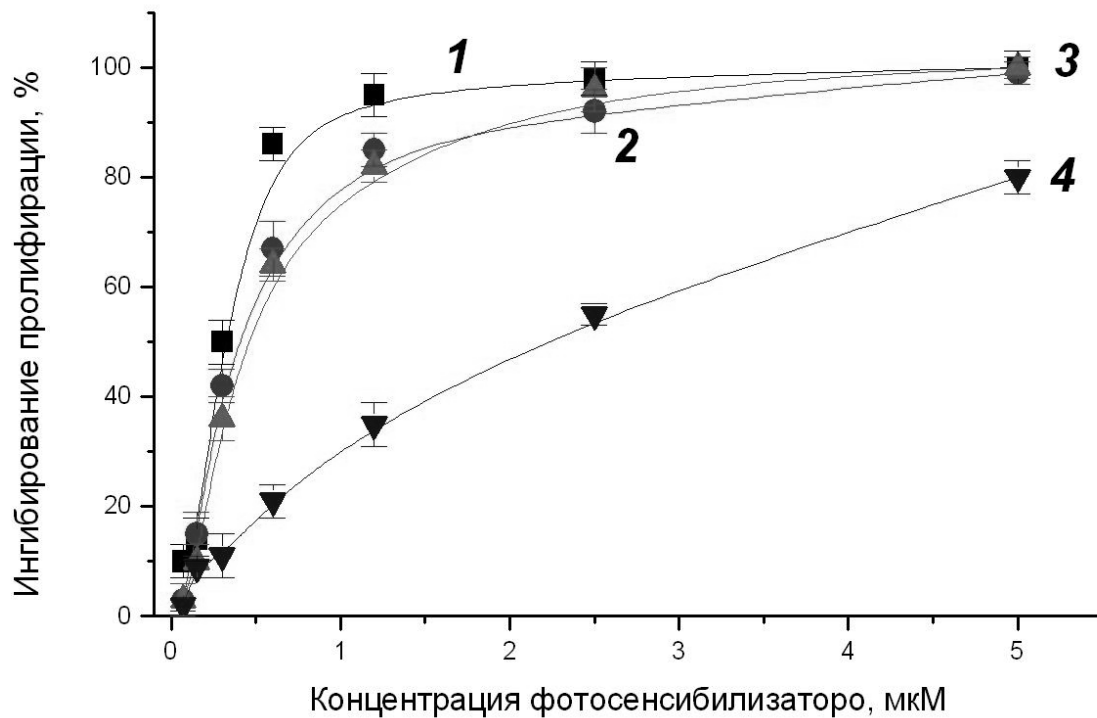


Рис. 3. Ингибирование пролиферации опухолевых клеток (HEp2) при ФДВ с: $H^2Pc(SO_3)_{\sim 2,5}$ (4, 1), $MgPc(SO_3)^{2,5}$ (5, 2), $ZnPc(SO_3)^{2,5}$ (6, 3) и препарата «Фотосенс» (4)

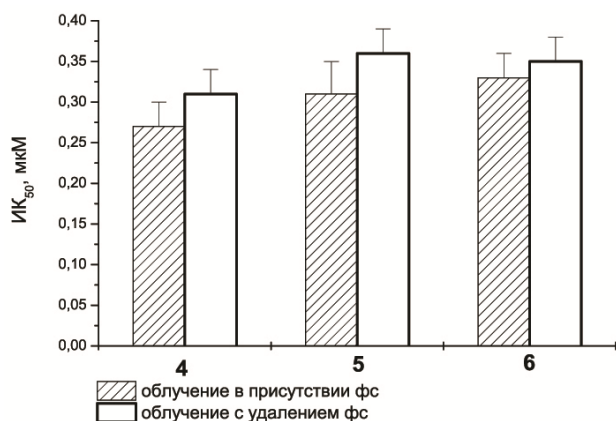


Рис. 4. Величина ИК₅₀ $\text{H Pc}(\text{SO})_2$ (4), $\text{MgPc}(\text{SO})_2$ (5) и $\text{ZnPc}(\text{SO})_2$ (6) в зависимости от их присутствия в среде во время облучения. Время инкубации 2 часа. Культура клеток HEp2

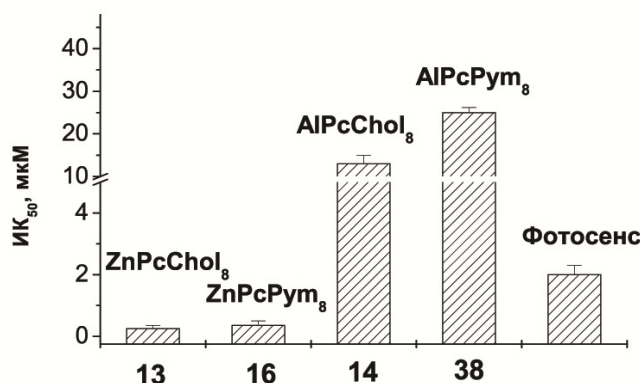


Рис. 5. Величина ИК₅₀ положительно заряженных Pс и «Фотосенс». Время инкубации 2 часа. Культура клеток HEp2:

№ ФС	Соединение	ИК ₅₀ , мкМ
13	ZnPcChol ₈	0,3±0,08
16	ZnPcPym ₈	0,35±0,1
14	AlPcChol ₈	13,0±0,1
17	AlPcPym ₈	25,0±0,1
	Фотосенс	2,00±0,08

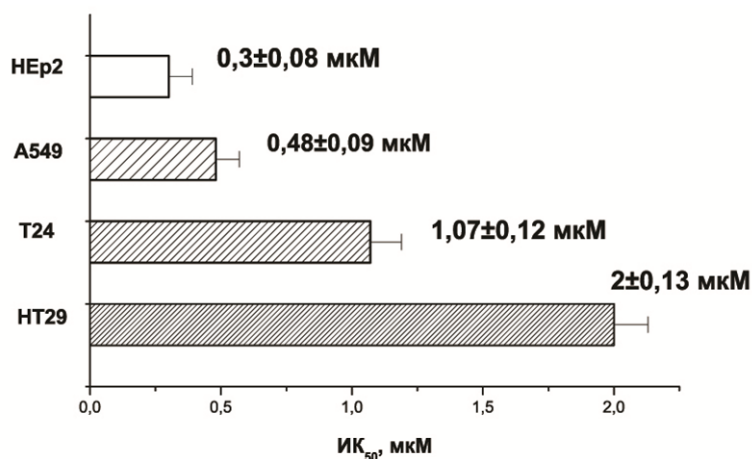


Рис. 6. Величина ИК₅₀ ZnPcChol_8 (13) на различных клеточных линиях.

По расширенной программе скрининга с использованием наиболее активного положительно заряженного Pс-ZnPcChol₈ (13) проведено сравнительное изучение эффективности фотодинамического воздействия на различных опухолевых клетках человека эпителиального происхождения: карцинома толстой кишки человека – HT29, карцинома мочевого пузыря человека – T24, аденокарцинома легкого человека – A549 и эпидермоидной карциномы гортаноглотки – HEp2 (рис. 6).

Показано, что чувствительность клеток к фотодинамическому воздействию с ФС возрастала в ряду: HT29 < T24 < A549 < HEp2 (ИК₅₀ составляла 2,00±0,13, 1,07±0,12, 0,48±0,09 и 0,30±0,08 мкМ соответственно).

Следует отметить, что даже самые устойчивые клетки культуры (HT29) в данном эксперименте погибали при достаточно низких концентрациях Pс, в то время как величина ИК₅₀ официального препарата «Фотосенс» для HT29 составляла 19,0±0,5 мкМ.

Заключение

Таким образом, изученные отрицательно заряженные Pс стабильны в растворах в темновых условиях и оказались фотостабильными, чем выгодно отличались от ФС других классов (пирофторбида *a* и хлоринов). Сравнительная оценка эффективности соединений относительно клеток в культуре в зависимости от боковых заместителей показала, что активность октакарбоксо-Рс цинка (1) и алюминия (2) оказалась существенно ниже (ИК₅₀ 200±15 мкМ и 130±20 мкМ, соответственно), чем сульфированных производных. Среди сульфированных Pс наиболее активными оказались безметальное соединение (4), а также магниевый (5) и цинковый (6) комплексы со степенью сульфирования 2,5 (ИК₅₀ в среднем составляла 0,2±0,08 мкМ), в то время как препарат «Фотосенс», также относящийся к классу Pс, проявлял существенно меньшую фотоиндуцированную цитотоксичность (ИК₅₀ = 2,0±0,1 мкМ). Отмечено, что сульфированные

металлокомплексы и безметалльное соединение эффективно проникают в опухолевые клетки и накапливаются в них. Безметалльный Рс (4) выбран для дальнейших экспериментов на животных и на его основе разработан препарат «Фталосенс-лио», доклинические испытания которого находятся в стадии завершения.

Изученные катионные Рс характеризовались стабильностью в растворах и не подвергались фотовыцветанию при воздействии светом (за исключением безметалльного холинового производного). Показано, что их фотоиндуцированная активность не зависела от природы боковых заместителей, но наличие атома цинка в молекуле в значительной

степени повышает специфическую активность соединений. Наибольшей эффективностью при ФДВ обладал цинковый комплекс с холиновым заместителем (13), который выбран для изучения в системе *in vivo*, и на его основе разработан препарат «Холосенс-лио».

Авторы выражают искреннюю благодарность за предоставление образцов для исследования сотрудникам ФГУП ГНЦ «НИОПиК»: вед. научн. сотр. Деркачевой В.М., вед. научн. сотр. Южаковой О.А., ст. научн. сотр. Соловьевой Л.И., зав. лаб. Негримовскому В.М.

Литература

1. Ганцев Ш.Х., Юсупов А.С. Плоскоклеточный рак кожи // «Практическая онкология». – 2012. – Т. 13, № 2. – С. 80–91.
2. Грин М.А. Синтез модифицированных природных хлорофиллов и изучение их свойств для бинарных методов терапии в онкологии. – Дисс. ... д-ра. хим. наук. – Москва, 2010.
3. Гуревич Д.Г., Меерович И.Г., Меерович Г.А. и др. Влияние размеров липосом на уровень и селективность накопления тиосенса в опухоли // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 45–9.
4. Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Орлова О.Л. и др. Липосомальная лекарственная форма борхлорина // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 37–42.
5. Дмитриева М.В., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. и др. Качественный анализ липосомальной лекарственной формы борхлорина // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 81.
6. Дмитриева М.В., Санарова Е.В., Полозкова А.П. и др. Анализ липосомальной лекарственной формы нового фотосенсибилизатора хлоринового ряда // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 28.
7. Дрожжина В.В., Осипчук Ю.С. Сравнительный анализ противоопухолевой активности фотосенсибилизаторов борированного хлорина и «борхлорина липосомального лиофилизата» после фотодинамической терапии саркомы М-1 крыс // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 45–50.
8. Кортава М.А., Оборотова Н.А., Меерович Г.А. и др. Оценка фотодинамической активности стерически стабилизированной лекарственной липосомальной формы и раствора Фотосенса на клеточной линии эпидермального рака кожи А-431 *in vitro* // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 1. – С. 18.
9. Кортава М.А., Рябова А.В., Игнатьева Е.В. и др. Изучение эффективности включения фотосенса в пространственно стабилизированные липосомы // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 4. – С. 96–101.
10. Красновский А.А. Фотодинамическое действие и синглетный кислород // Биофизика. – 2004. – Т. 49, вып.2. – С. 305–21.
11. Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И., Дмитриева М.В., Оборотова Н.А. Изучение «острой» токсичности липосомальной лекарственной формы борхлорина // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 51–6.
12. Лукьянец Е.А. Синтетический поиск фотосенсибилизаторов для ФДТ // Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. – 2013. – Т. 13, № 3. – С. 3–16.
13. Меерович И.Г., Волков К.А., Меерович Г.А. и др. Предварительные исследования *in vitro* нового инфракрасного фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии опухолей на основе мицеллярной дисперсии 4,5октакис(децилтио)-3,6-октахлокорфталоцианина цинка // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 41–4.
14. Меерович И.Г., Оборотова Н.А. Применение липосом в фотохимиотерапии: 1. Липосомы в ФДТ // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 3–8.
15. Миронов А.Ф., Грин М.А., Пантюшенко И.В. и др. Создание ИК-фотосенсибилизаторов на основе производных бактериохлорофилла А для фотодинамической терапии рака // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 56.
16. Миронов А.Ф. Фотосенсибилизаторы на основе порфиринов и родственных соединений для ФДТ рака // Итоги науки и техники. – 1990. – Т.3. – С. 5–63.
17. Осипчук Ю.С., Дрожжина В.В. Фотодинамическая терапия саркомы М-1 крыс с использованием нового фотосенсибилизатора борхлорин липосомальный лиофилизат // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 47–50.
18. Пурихванидзе В.А., Странадоко Е.Ф., Пономарев Г.В. Фотодинамическая терапия обширных и рецидивных злокачественных поражений кожи и внутрикожных метастазов // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 43.
19. Санарова Е.В., Ланцова А.В., Дмитриева М.В. и др. Фотодинамическая терапия - способ повышения селективности и эффективности лечения опухолей фотосенсибилизатора // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 109–18.
20. Санарова Е.В., Оборотова Н.А., Смирнова З.С. и др. Применение липосомальных систем доставки для создания нового эффективного противоопухолевого фотосенсибилизатора // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 72.

21. Смирнова З.С., Меерович И.Г., Лукьянец Е.А. и др. Фенилтиозамещенные фталоцианины – новые фотосенсибилизаторы ближнего инфракрасного диапазона // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 54–60.
22. Смирнова З.С., Оборотова Н.А., Макарова О.А. и др. Эффективность и фармакокинетика липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора «Фотосенс» на основе сульфатфалоцианина // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – Т. 39, №7. – С. 3–7.
23. Страховская М.Г., Беленикина Н.С., Никитина В.В. и др. Перспективный фотосенсибилизатор для антимикробной фотодинамической терапии // Клиническая практика. – 2013. – № 1. – С. 25–30.
24. Чан Тхи Хай Иен, Поздеев В.И., Меерович Г.А. и др. Липосомальная лекарственная форма фотодитазина // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, №2. – С. 105–7.
25. Чан Тхи Хай Иен, Раменская Г.В., Оборотова Н.А. Фотосенсибилизаторы хлоринового ряда в фотодинамической терапии опухолей // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 4. – С. 99–105.
26. Якубовская Р.И., Плотникова Е.А., Морозова Н.Б. и др. Перспективный фотосенсибилизатор нового поколения для фотодинамической терапии: мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 143.
27. Acedo P., Stockert J.C., Cañete M., Villanueva A. Two combined photosensitizers: a goal for more effective photodynamic therapy of cancer // Cell Death Dis. – 2014. – 13. – P. 1–12.
28. Ascencio M, Collinet P, Cosson M. et al. The place of photodynamic therapy in gynecology //Gynecol Obstet Fertil. – 2007. – 35(11). – P. 1155–65.
29. Ball D.J., Mayhew S., Wood S.R. et al. A comparative study of the cellular uptake and photodynamic efficacy of three novel zinc phthalocyanines of different charge // Photochem Photobiol. – 1999. – 69(3). – P. 390–6.
30. Bayrak R., Akçay H.T., Beriş F.S. et al. Synthesis, aggregation and spectroscopic studies of novel water soluble metal free, zinc, copper and magnesium phthalocyanines and investigation of their anti-bacterial properties // Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. – 2014. – 7(133). – P. 272–80.
31. Chissov V., Vashakmadse L., Butenko A. et al. Laparoscopic intraperitoneal photodynamic diagnosis (PDD) and photodynamic therapy (PDT) in oncology // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2008. – 5(1) – P. 86–7.
32. Jori G., Brown S.B. Photosensitized inactivation of microorganisms // Photochem Photobiol Sci. – 2004. – 3. – P. 403–5.
33. Lukyanets E.A., Nemykin V.N. The key role of peripheral substituents in the chemistry of phthalocyanines and their analogs // J. Porphyrins Phthalocyanines. – 2010. – 14. – P. 1–40.
34. Maduray K., Odhav B. The in vitro photodynamic effect of laser activated gallium, indium and iron phthalocyanine chlorides on human lung adenocarcinoma cells // J Photochem Photobiol B. – 2013. – 5(188). – P. 56–63.
35. Makarova E.A., Dzyuina E.V., Fukuda T. et al. Synthesis and spectroscopic and electrochemical studies of pyrazine- or pyridine-ring-fused tetraazachlorins, bacteriochlorins, and isobacteriochlorins // Inorg Chem. – 2009. – 5(48). – P. 164–73.
36. Minnock A., Vernon D.I., Schofield J. et al. Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of Escherichia coli // Antimicrob Agents Chemother. – 2000. – 44(3). – P. 522–7.
37. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survivals: application to proliferation and cytotoxicity assay // Journal of Immunological Methods. – 1983. – 65. – P. 55–63.
38. Nemykin V.N., Lukyanets E.A. Synthesis of substituted phthalocyanines // ARKIVOC. – 2010. – I. – P. 136–208.
39. Saini R., Poh C.F. Photodynamic therapy: a review and its prospective role in the management of oral potentially malignant disorders // Oral Dis. – 2013. – 19(5). – P. 440–51.
40. Wilson B.C., Patterson M.S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy // Phys Med. Biol. – 2008. – 53(9). – P. 61–109.

СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АФДТ	– антимикробная фотодинамическая терапия
ФДВ	– фотодинамическое воздействие
ФДТ	– фотодинамическая терапия
ФС	– фотосенсибилизатор
Рс	– фталоцианин

УДК 615.3.014.2:577.352.2

*А.О. Райков^{1,2}, А.А. Матюшин¹, И.И. Краснюк¹***ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ МИТОКСАНТРОНА**¹*Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва*²*ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва***Контактная информация***Райков Александр Олегович, аспирант кафедры фармацевтической технологии***адрес:** 119019 Москва, Никитский б-р, д. 13; **тел.** +7(495) 291-85-20**e-mail:** alexsan.dr@mail.ru

Статья поступила 17.10.2014, принята к печати 23.11.2014.

Резюме

Цель исследования – получение липосомальной лекарственной формы митоксантрона с \varnothing везикул 100–115 нм. Липосомы получали методом обращения фаз из фосфолипидов, DSPE-PEG2000 и холестерина с последующим пропусканием через поликарбонатные мембранные фильтры с \varnothing пор 400; 200 и 100 нм с нагреванием и без. В исследовании использовалась активная загрузка с использованием градиента сульфата аммония. Эффективность загрузки митоксантрона составила 94,9 %, средний размер липосом – 105 ± 6 нм.

Ключевые слова: митоксантрон, липосомы, экструзия.*А.О. Raikov^{1,2}, А.А. Matyushin¹, I.I. Krasnyuk¹***OPTIMIZATION METHOD OF RECEIVING LIPOSOMAL FORMS OF MITOXANTRONE**¹*I.M. Sechenov First Moscow Medical University*²*FSBSI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow***Abstract**

Our study aimed to produce liposome formulation of mitoxantrone with mean size 100-115 nm. Liposomes were prepared by reverse evaporation method using phospholipids, lipid-grafted, cholesterol, with followed by passage through polycarbonate membrane filters with pore diameters of 100; 200 and 400 nm, with heating and without heating. The study used an active loading by using ammonium sulfate gradient. Loading efficiency of mitoxantrone was 94,9 %, mean liposome size – 105 ± 6 nm.

Key words: mitoxantrone, liposome, extrusion.**Введение**

Последние два десятилетия активно разрабатываются липосомальные формы доставки лекарственных препаратов [4; 5; 8; 18; 37; 44; 45]. Некоторые из них дошли до практического клинического применения [32–34; 48–53]. Особенно интенсивно липосомальные препараты внедряют в практику онкологических учреждений для лечения злокачественных новообразований. В первую очередь это обусловлено особенностями кровоснабжения опухоли [12; 61; 69; 76–80]. Опухоль растет быстро, и образование новых сосудов не успевает за ее ростом [64]. Вследствие этого в эндотелии кровеносных сосудов образуются поры размером до 700 нм, в которые могут проникать наночастицы, в том числе и липосомы [17]. В нормальных сосудах поры в эндотелии имеют размер меньше 2 нм в большинстве тканей, 6 нм – в посткапиллярных венулах, 40–60 нм – в почечных клубочках и до 150 нм – в синусоидальном эпителии печени и селезенки. Липосомы проникают в опухолевый узел и застревают в строме [40]. Мелкие липосомы могут снова выходить в кровоток. Это обстоятельство вынуждает создавать липосомы размером 100–200 нм. Вторым фактором, влияющим на расширение применения липосомальных препаратов, являются фармакокинетические характеристики липосом. Бислой липосом похож на мембрану живой клетки, поэтому они биосовместимы. Липосомы биодegradуемы и нетоксичны [30; 35; 36]. Водорастворимые препараты включаются во внутреннее про-

странство липосомы [2; 3; 67]. Жирорастворимые субстанции включаются в липидный бислой [42; 43; 46; 47]. Этим объясняется появление большого количества липосомальных препаратов для фотодинамической терапии [19–21; 26; 54–60; 72; 75]. Для защиты от захвата клетками РЭС в состав липосом включается ПЭГ с ММ 2000 и создает вокруг липосомы повышенное осмотическое давление, препятствуя контакту липосом с фагоцитирующими клетками. В связи с этим липосомы долгое время циркулируют в кровотоке и постепенно накапливаются в опухоли [40]. Кроме того, липосомальные препараты преодолевают МЛУ и резистентность к действию препаратов, обусловленную отсутствием CD95/Fas-рецептора внешнего апоптоза [9–11; 13; 73]. Хороший терапевтический эффект оказывает также накопление в опухоли большого количества препарата [38; 71]. Для бонусного высвобождения препарата разрабатываются термочувствительные липосомы, которые расплавляются при заданной температуре (при этом сразу высвобождается большое количество лекарства [65; 66]). Для специфического связывания липосом с опухолевыми клетками многие группы исследователей разрабатывают иммунолипосомы [1; 6; 7; 22 – 25; 29; 39; 41; 68; 74].

Фармакокинетические характеристики липосом зависят от физико-химических свойств, таких как: размер, поверхностный заряд, структура липидного бислая, стерическая стабилизация, доза и путь введения. В связи с этим совершенствуются составы липосомальных лекарственных форм для

повышения доли включения препарата в липосомы, лучшей стабильности, упрощения технологии производства и практического применения [14–16; 27; 28; 31; 62; 63].

Одной из групп препаратов, активно используемых при создании липосомальных лекарственных форм, являются антибиотики антрациклинового ряда: митоксантрон, доксорубин, даунорубин, акларубин и др., – широко применяемые в химиотерапии целого ряда онкологических заболеваний. Одним из существенных недостатков данной группы препаратов является их токсичность по отношению к тканям костного мозга, эпителия желудочно-кишечного тракта, сердечной мышцы, почек. Повышение специфичности действия и изменение фармакокинетики лекарственных препаратов этой группы является актуальным вопросом.

Основной задачей в процессе данного исследования являлось уменьшение размеров липосом, загруженных митоксантроном, с помощью изменения состава и существующей технологии получения липосом. Ранее липосомальную форму митоксантрона получали с использованием ЕРС, с добавлением холестерина и ПЭГ, конъюгированного с фосфатидилэтаноламином [41; 70]. При этом холестерин добавлялся в целях придания необходимой «жесткости» конструкции, а ПЭГ – для достижения длительной циркуляции. Данная смесь пропусклась последовательно через поликарбонатные фильтры с размером 400; 200 и 100 нм для получения однослойных липосом.

Для модификации данной лекарственной формы было решено изменить состав и использовать гидрогенизированный соевый фосфатидилхоллин в качестве основного компонента.

Материалы и методы

Препараты и реактивы. Фосфатидилхоллин (S PC-3)(Lipoid, Германия); 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-карбонил-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (PE 18 : 0/18 : 0 – PEG 2000; Lipoid, Германия); Холестерин (Sigma aldrich, США).

Приборы и аппаратура. Испаритель ротационный ВÜСНІ Rotavapor R-200 (ВÜСНІ Labortechnik AG, Швейцария), наносайзер Nicomp 380 Submicron Particle Sizer (Particle Sizing Systems, США), мини-экструдер Avanti Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids, Inc., США), поликарбонатные мембранные фильтры, система очистки воды Elix 5 (Millipore S.A.S., Франция), спектрофотометр DU 800 (Beckman Coulter, США)

Получение липосомальных везикул

Для приготовления липосом использовали метод обращения фаз. Точные навески фосфатидилхолина, холестерина, DSPE-PEG2000 растворяли в хлороформе. Смесь переносили в круглодонную колбу вместимостью 150 мл и упаривали органический растворитель на ротаторном испарителе под вакуумом при температуре 40±2 °С до образования липидной пленки. Пленку сушили под вакуумом в течение 40–50 мин, далее гидратировали р-ром сульфата аммония при постоянном перемешивании до полного исчезновения пленки со стенок колбы и образования белой эмульсии (дисперсия многослойных липосом). Для получения однослойных липосом использовался метод экструзии, основанный на продавливании дисперсии липосом через поликарбонатные мембранные фильтры на ручном мини-

экструдере без подвода тепла или при температуре +55 °С. Дисперсию многослойных липосом помещали в шприцы мини-экструдера, которые затем устанавливали на нагреваемый блок. Затем шприцы оставляли на 10 минут – для выравнивания температуры. Далее начинали экструзию. Производилось 15 циклов экструзии. Температура фиксировалась с помощью термометра на блоке мини-экструдера.

Загрузка ЛМ

Загрузка липосом митоксантроном производилась против градиента сульфата аммония. Весовое соотношение препарат : липиды составило 0,12 : 1. Градиент концентрации сульфата аммония формировался при пятикратном разбавлении липосомальной дисперсии буфером, содержащим 10 мМ HEPES и 145 мМ раствор хлорида натрия (рН 8,2-8,4). Полученную смесь инкубировали 60 мин на водяной бане при температуре +50° С, затем 12 ч при температуре +5 ° С. Нагревание производилось для увеличения проницаемости липидной мембраны. Разделение загруженных частиц от фракции не включившегося митоксантрона для последующего анализа включения митоксантрона производили методом гельфильтрации на сорбенте G-50 standart (колонка С10/20).

Измерение размеров липосом

Анализ среднего ϕ полученных везикул и оценку их распределения по размерам проводили с использованием метода корреляционной спектроскопии светорассеяния (динамического лазерного светорассеяния) с помощью прибора Nicomp 380 Submicron Particle Sizer. Образцы готовили непосредственно перед проведением измерений. Концентрацию везикул подбирали таким образом, чтобы частота импульсов, поступающих на фотоэлектронный умножитель, составляла 200-600кГц. В качестве дисперсионной среды использовали предварительно дегазированную деионизированную воду. В стеклянную кювету размером 6×50 мм вносили 20 мкл исследуемого образца (свежеприготовленных везикул) и добавляли деионизированную воду до 1мл. Затем кювету помещали в прибор и начинали процесс измерения. Продолжительность измерений составляла 10 мин и более. На экране монитора наблюдали кривую распределения липосом по размерам. Все математические операции проводили с помощью компьютерной программы.

Количественное определение митоксантрона в липосомах

Для определения митоксантрона в липосомальной дисперсии применяли спектрофотометрическую методику количественного определения вещества с использованием РСО митоксантрона при длине волны 242±2нм, применяемую ранее [70]. Измерение оптической плотности спиртовых растворов проводили относительно 95 %-ного этилового спирта в кюветках с толщиной оптического слоя 10 мм.

Содержание митоксантрона (X, мг) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{D \times a \times C}{D_0 \times C_0}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность раствора образца;
D₀ – оптическая плотность РСО Мит;
C – величина разбавления образца;
C₀ – величина разбавления РСО Мит;
a – навеска РСО Мит, мг.

Эффективность включения митоксантрона в липосомы (B , %) рассчитывали по формуле:

$$B = \frac{D_1 \times C_1 \times V_1}{D \times C \times V} \times 100\%, \text{ где}$$

D_1 – оптическая плотность раствора фракции с очищенным липосомальным Мит;

D – оптическая плотность раствора исходной липосомальной дисперсии;

C_1 – величина разбавления фракции с очищенным липосомальным Мит;

C – величина разбавления исходной липосомальной дисперсии;

V_1 – объем фракции с очищенным липосомальным Мит, мл;

V – объем исходной липосомальной дисперсии, нанесенной на колонку, мл.

Все растворы использовали *ex tempore*.

Результаты и обсуждение

Яичный фосфатидилхолин является смесью лецитинов и обладает меньшей стабильностью по сравнению с чистыми фосфатидилхолинами. Известно, что липосомы, состоящие только из фосфатидилхолина отличаются низкой стабильностью и высокой степенью утечки препарата [4]. Для стабилизации яичного фосфатидилхолина в составе липосом, используется холестерин. При создании липосомальной формы митоксантрона было решено использовать гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин HSPC с высоким содержанием насыщенных жирных кислот, что повышает химическую и физическую стабильность конечной лекарственной формы. Однако липосомы, состоящие из фосфолипидов с насыщенными остатками жирных кислот, значительно хуже поддаются экструзии через поликарбонатные мембранные фильтры. В связи с этим при изготовлении липосом необходимо учитывать характеристики смеси липидов. В то же время, липосомы, состоящие из насыщенных жирных кислот, являются более стабильными, что позволяет уменьшить используемое количество холестерина в сравнении с липосомами, состоящими из яичных фосфатидилхолинов. Таким образом, в отличие от формы, состоящей из яичного фосфатидилхолина, холестерина и модифицированного полиэтиленгликолем фосфатидилэтаноламина в молярном соотношении EPC : Chol : mPEG2000-DSPE 11 : 9 : 1) [41], была использована композиция, содержащая HSPC, холестерин и модифицированный фосфатидилэтаноламин в молярном соотношении HSPC : Chol : mPEG2000-DSPE 6 : 3 : 1, что заставило незначительно изменить технологию получения однослойных липосом, добавив нагревание при экструдировании до температуры +55 °С.

Приведенные изменения состава и технологии привели к изменению размера частиц с 141 ± 6 нм при использовании смеси яичного фосфатидилхолина и без нагревания при экструзии до 105 ± 6 нм, при использовании HSPC и нагрева при экструзии.

Литература

1. Алексеева А.С., Анкаева М.Р., Щегловитова О.Н. и др. Специфическое связывание и накопление в эндотелиальных клетках цитотоксических липосом с лигандом селектинов сиалил-Люис-Х // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, №1. – С. 58.
2. Альбассит Б., Зангиева М.Т., Барышникова М.А. и др. Липосомальный противоопухолевый препарат ОР-2011 из класса нитрозомочевины для лечения меланомы // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, №1. – С. 59.

Кроме того, нагретая дисперсия многослойных липосом является более текучим составом, удалось получить липосомы заданного размера без применения дополнительных мембранных фильтров \varnothing 400 и 200 нм. Состав пропускали сразу через фильтр \varnothing 100 нм.

Изменения процедуры загрузки и липидной композиции

липосомального митоксантрона

Процедура активной загрузки липосомального митоксантрона против градиента сульфата аммония при использовании липидной композиции Chol : mPEG2000-DSPE (11 : 9 : 1) производилась с использованием 250 мМ сульфата аммония [70]. При изменении базового липида на HSPC загрузка предыдущим методом стала менее эффективной и упала до $70 \pm 6\%$. Вероятно этот факт связан с меньшей проницаемостью липидной мембраны по отношению к проницаемости липидной стенки у предшествующей композиции.

Было решено изменить процедуру загрузки и повысить концентрацию сульфата аммония до 300 мМ, кроме того, для увеличения проницаемости липидной мембраны применили нагрев липидной композиции. Исследованы три липидных композиции с различным содержанием липидов и холестерина. Результаты загрузки представлены в табл. Весовое соотношение препарат : суммарные липиды составило 0,12 : 1.

Наиболее эффективное включение и стабильность липосомальных наночастиц показали липосомы состава МП-3 с молярным соотношением липидов HSPC : Chol : mPEG2000-DSPE (60 : 39,5 : 0,5). Их средний размер после загрузки составил 105 ± 6 нм.

Дисперсия данного состава была наиболее однородна и легче поддавалась экструзии через поликарбонатные мембранные фильтры.

Влияние состава липидов на включение митоксантрона в липосомы

Партия препарата	Соотношение липидов (моль%) HSPC/Chol /PEG-DSPE	Эффективность загрузки, %
МП-1	50 : 49,5 : 0,5	85,6 ± 4
МП-2	70 : 29,5 : 0,5	94,9 ± 3
МП-3	60 : 39,5 : 0,5	96,8 ± 3

Выводы

1. Были подобраны оптимальные условия для процедуры загрузки липосом, содержащих насыщенный соевый фосфатидилхолин, холестерин и mPEG2000-DSPE
2. В результате исследования удалось получить липосомы, загруженные митоксантроном, с диаметром везикул 105 нм.

3. Альбассит Б., Барышникова М.А., Игнатъева Е.В. и др. Разработка липосомальной лекарственной формы нового соединения из класса нитрозоалкилмочевины // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – №2. – С. 5.
4. Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Соколова З.А., Косоруков В.С. Разработка липосомальной конструкции, содержащей лизат опухолевых клеток // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 5.
5. Барышников А.Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов // Вестник РАМН. – 2012. – №3. – С. 23–30.
6. Барышников А.Ю., Барышникова М.А. Иммунолипосомы и мишени их действия // Российский химический журнал. Журнал Российского химического общества им. Д.И.Менделеева 2012. – Т. LVI, № 3–4. – С. 60–7.
7. Барышников А.Ю., Оборотова Н.А. Иммунолипосомы – новое средство доставки лекарственных препаратов // Современная онкология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 4.
8. Барышникова М.А., Альбассит Б., Сапрыкина Н.С. и др. Противоопухолевая активность нового соединения из класса нитрозометилмочевин // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 8.
9. Барышникова М.А., Грищенко Н.В., Бурова О.С. и др. Роль CD95/Fas рецептора в индукции апоптоза противоопухолевыми препаратами // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 3–8.
10. Барышникова М.А., Грищенко Н.В., Полозкова А.П. Влияние лекарственных форм аранозы на индукцию апоптоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 64.
11. Барышникова М.А., Зангиева М., Барышников А.Ю. Взаимодействие липидных нанокапсул с клеткой // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 11–5.
12. Григорьева И.Н., Харатешвили Т.К., Барышников А.Ю. Васкулогенная мимикрия: альтернативный механизм кровоснабжения опухоли? // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 25–30.
13. 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. – Т. 13, № 1. – С. 37–42.
14. Грищенко Н.В., Альбассит Б., Барышникова М.А. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм противоопухолевых препаратов из класса нитрозомочевин // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 49–54.
15. Гулякин И.Д., Санарова Е.В., Ланцова А.В. и др. Разработка наноструктурированной модели лекарственной формы производного индолкарбазола – ЛХС-1208 // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 78.
16. Гулякин И.Д., Николаева Л.Л., Санарова Е.В. и др. Применение фармакологической технологии для повышения биодоступности лекарственных веществ // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 101–8.
17. Гуревич Д.Г., Меерович И.Г., Меерович Г.А. и др. Влияние размеров липосом на уровень и селективность накопления тиосенса в опухоли // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 45–9.
18. Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Санарова Е.В. и др. Наноструктурированные системы доставки противоопухолевых препаратов // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 21–7.
19. Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Орлова О.Л. и др. Липосомальная лекарственная форма борхлорина // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 37–42.
20. Дмитриева М.В., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. и др. Качественный анализ липосомальной лекарственной формы борхлорина // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 81.
21. Дрожжина В.В., Осипчук Ю.С. Сравнительный анализ противоопухолевой активности фотосенсибилизаторов боронового хлорина и «борхлорина липосомального лиофилизата» после фотодинамической терапии саркома М-1 крыс // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 45–50.
22. Зангиева М.Т., Барышникова М.А., Игнатъева Е.В. и др. Разработка состава пространственно стабилизированных иммунолипосом направленных против Her-2 рецептора // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 85.
23. Зангиева М.Т., Игнатъева Е.В., Косоруков В.С. Оценка эффективности включения доксорубина в иммунолипосомы, направленные против Her-2 рецептора // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 31.
24. Зангиева М.Т., Игнатъева Е.В., Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Разработка оптимального состава пространственно стабилизированных липосом, нагруженных доксорубицином // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 18.
25. Зангиева М.Т., Матюшин А.А., Соколова Д.В. и др. Разработка и исследование иммунолипосомальных конструкций in vitro // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 19–28.
26. Истомин Ю.К., Артемьева Т.П., Александров Е.Н., Церковский Д.А. Сонодинамическая и соннофотодинамическая терапия злокачественных опухолей с использованием фотосенсибилизаторов // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 119–28.
27. Козеев С.Г., Барышникова М.А., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. Разработка наноструктурированной лекарственной формы аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 24.
28. Козеев С.Г., Барышникова М.А., Афанасьева Д. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 24.
29. Коняева О.И., Кульбачевская Н.Ю., Ермакова Н.П. и др. Доклиническое изучение общетоксического

- действия лиофилизированной липосомальной формы тиосенса (ЛЛЛФТ) // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 43.
30. Котова Е.А., Смирнова З.С., Краснюк И.И. и др. Противоопухолевое действие липосомальной формы цифелина на лейкоз P-388 // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 46.
 31. Кортава М.А., Палкина Т.Н., Толчева Е.В. и др. Подходы к созданию иммунолипосом на примере доксорубина // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 1. – С. 6.
 32. Краснопольский Ю.М., Балабаньян В.Ю., Шаболов Д.Л., Швец В.И. Перспективы применения в клинической практике наноразмерных форм лекарственных препаратов // Российский химический журнал. – 2012. – № 3–4. – С. 11–32.
 33. Краснопольский Ю.М., Балабаньян В.Ю., Шаболов Д.Л., Швец В.И. Липосомальные лекарственные препараты в онкологии // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 48.
 34. Краснопольский Ю.М., Степанов А.Е., Швец В.И., Шахмаев А.Е. Липосомальные препараты для вспомогательной терапии в онкологии // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 3. – С. 29.
 35. Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И., Дмитриева М.В., Оборотова Н.А. Изучение «острой» токсичности липосомальной лекарственной формы борхлорина // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 51–6.
 36. Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И., Ермакова Н.П. и др. Изучение «хронической» токсичности лиофилизированной липосомальной лекарственной формы тиосенса на крысах // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 30.
 37. Ланцова А.В., Барышникова М.А., Санарова Е.В. и др. Изучение в системе *in vitro* наноструктурированной лекарственной формы лизомустина // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 31.
 38. Ланцова А.В., Сапрыкина Н.С., Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Противоопухолевая активность наноструктурированной формы лизомустина на мышах с солидной опухолью меланомы В-16 // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 52.
 39. Левачева И.С., Барышникова М.А. Направленная доставка противоопухолевых препаратов липосомами // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 32.
 40. Матюшин А.А., Барышникова М.А., Барышников А.Ю., Караулов А.В. Липосомы: организм, опухоль, клетка // Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. – 2013. – Т. 17, № 6. – С. 3–10.
 41. Матюшин А.А., Хугаева О.В., Барышникова М.А. и др. Получение и изучение анти-CD20 иммунолипосомального митоксантрона *in vitro* // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 15–24.
 42. Меерович И.Г., Оборотова Н.А. Применение липосом в фотохимиотерапии: 1. Липосомы в ФДТ // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 3–8.
 43. Меерович И.Г. Мицеллярный фотосенсибилизатор на основе 4,5-октакис(децило)-3,6-октахлорофталогцианина цинка Октасенс // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 41–4.
 44. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Клименко О.В. и др. Разработка липосомальной формы противоопухолевой вакцины // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 62–6.
 45. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Багирова Н.С. и др. Стерилизация многослойных протеолипосом // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 1. – С. 9–12.
 46. Моисеева Е.В., Кузнецова Н.Р., Аронов Д.А. и др. Противоопухолевое действие липосом с липофильным пролекарством комбрет астана А4 на модели острого Т-клеточного лейкоза мышей // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 3–10.
 47. Моисеева Е.В., Кузнецова Н.Р., Ситников Н.С. и др. Противоопухолевый эффект наноразмерных липосом с липофильным пролекарством комбрета статина А4 на мышинной модели острого Т-лейкоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 36.
 48. Оборотова Н.А. Направленная доставка противоопухолевых препаратов // Антибиотики и химиотерапия. – 1991. – Т. 36, № 10. – С. 47.
 49. Оборотова Н.А. Липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – Т. 35, № 5. – С. 30.
 50. Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Липосомальные лекарственные формы в клинической онкологии // Успехи современной биологии. – 2009. – Т. 121, № 5. – С. 464.
 51. Оборотова Н.А. Основные проблемы создания лекарственных форм противоопухолевых препаратов для внутривенного введения // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 2. – С. 27–31.
 52. Оборотова Н.А., Санарова Е.В. Роль новых фармацевтических технологий в повышении избирательности действия противоопухолевых препаратов // Российский химический журнал. – 2012. – Т. 11, № 3–4. – С. 33–40.
 53. Оборотова Н.А., Смирнова З.С., Полозкова А.П., Барышников А.Ю. Фармацевтические аспекты разработки липосомальных лекарственных форм для внутривенного введения гидрофобных цитостатиков // Вестник РАМН. – 2002. – № 1. – С. 42–5.
 54. Осипчук Ю.С., Дрожжина В.С. Фотодинамическая терапия саркомы М-1 крыс с использованием нового фотосенсибилизатора борхлорин липосомальный лиофилизат // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 47–50.
 55. Санарова Е.В., Оборотова Н.А., Смирнова З.С. и др. Применение липосомальных систем доставки для создания нового эффективного противоопухолевого фотосенсибилизатора // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 72.
 56. Санарова Е.В., Ланцова А.В., Дмитриева М.В. и др. Фотодинамическая терапия – способ повышения селективности и эффективности лечения опухолей // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13. – № 3. – С. 109 – 118.

57. Смирнова З.С., Кубасова И.Ю., Макарова О.А. и др. Доклиническое изучение липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 40–5.
58. Смирнова З.С., Миерович И.Г., Лукьянец Е.А. и др. Фенилтиозамещенные фталоцианины – новые фотосенсибилизаторы ближнего инфракрасного диапазона // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 54–60.
59. Смирнова З.С., Оборотова Н.А., Макарова О.А. и др. Эффективность и фармакокинетика липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора «Фотосенс» на основе сульфатфалоцианина // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – Т. 39, № 7. – С. 3–7.
60. Смирнова З.С., Санарова Е.В., Борисова Л.М. и др. Противоопухолевая активность фотодинамической терапии с липосомальной лекарственной формой тиосенса на перевиваемых опухолях мышей // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 56–60.
61. Соломко Э.Ш., Степанова Е.В., Абрамов М.В. и др. Ингибиторы ангиогенеза растительного происхождения: перспективы использования в клинической онкологии // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 3–10.
62. Соколова Д.В., Тазина Е.В., Кортава М.А. и др. Анти-MUC-1 иммунолипосомальная конструкция доксорубина для направленной доставки в опухоль // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 99–103.
63. Соколова Д.В., Трещалина Е.М., Андропова Н.В. и др. Модели для доклинического изучения in vivo противоопухолевой активности таргетных препаратов против антигена MUC-1 // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 3. – С. 55–60.
64. Степанова Е.В., Барышников А.Ю., Личиницер М.Р. Оценка ангиогенеза опухолей человека // Успехи современной биологии. – Т. 120, № 6. – С. 599.
65. Тазина Е.В., Оборотова Н.А. Селективная доставка препаратов в опухоль с помощью термочувствительных липосом и локальной гипертермии // Российский биотерапевтический журнал. – 2008. – Т. 7, № 3. – С. 4–12.
66. Тазина Е.В., Мецержакова В.В., Игнатьева Е.В. и др. Биофармацевтические исследования термочувствительной липосомальной лекарственной формы доксорубина // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 1. – С. 40–7.
67. Толчева Е.В., Оборотова Н.А. Липосомы как транспортное средство для доставки биологически активных молекул // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 54–61.
68. Толчева Е.Н., Барышников А.Ю., Оборотова Н.А. и др. Анти-CD5-иммунолипосомы как транспортная система для направленной доставки лекарственных препаратов к CD5+клеткам // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 4. – С. 38–43.
69. Франциянц Е.М., Комарова Е.Ф., Верескунова М.И. Состояние некоторых маркеров ангиогенеза и пролиферации в ткани опухолей репродуктивной системы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 58.
70. Хугаева О.В., Кортава М.А., Зангиева М.Т. и др. Химико-фармацевтические исследования липосомальной формы митоксантрона // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 41–6.
71. Хугаева О.В., Яворская Н.П., Голубева И.С. и др. Сравнительное изучение противоопухолевой активности различных лекарственных форм митоксантрона // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 3. – С. 51–4.
72. Чан Тху Хай Иен, Поздеев В.И., Меерович Г.А. и др. Липосомальная лекарственная форма фотодитазина // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 2. – С. 105–7.
73. Шоуа И.Б., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. и др. Действие липосомального доксорубина на клетки линии, экспрессирующие активный pgr170 // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 20–3.
74. Baryshnikov A.Yu., Baryshnikova M.A. Immunoliposomes and their targets // Russian J. General Chemistry. – 2013. – 83(12). – P. 2565–70.
75. Derkacheva V.M., Meerovich G.A., Meerovich I.G. et al. Heterooxyaluminium tetra-3-phenyl thiophtalocianin is a new effective photosensitizer for photodynamic therapy and fluorescent diagnosis // Bulletin Experimental Biology and Medicine. – 2005. – 139(4). – P. 422–30.
76. Seymour L.W. Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates // CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. – 1992. – 9. – P. 135–87.
77. Vartanian A.A., Burova O.S., Stepanova E.V. et al. The involvement of apoptosis in melanoma vasculogenic mimicry // Melanoma Research. – 2007. – 17(1). – P. 1–8.
78. Vartanian A.A., Burova O.S., Stepanova E.V. et al. Melanoma vasculogenic mimicry is strongly related to reactive oxygen species level // Melanoma Research. – 2007. – 17(6). – P. 370–9.
79. Vartanian A.A., Stepanova E.V., Gutorov S.V. et al. Prognostic significance of periodic acid-schiff-positive patterns in clear cell renal carcinoma // The Canadian Journal of Urology. – 2009. – 16(4). – P. 4726–32.
80. Vartanian A.A., Stepanova E.V., Grigorjeva I. et al. VEGFR1 and PKCa signaling control melanoma vasculogenic mimicry in a VEGFR2 kinase-independent manner // Melanoma Research. – 2011. – 21(2). – P. 91–8.

СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ГСФ	– гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин
РЭС	– ретикуло-эндотелиальная система
РСО	– рабочий стандарт образца
ЛИМ	– липосом митоксантроном
ЕРС	– яичный фосфатидилхолин

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 616.211-002-079:615.373:57.08.3

*И.Н. Григорьева^{1,2}, И.В. Манина¹, Н.В. Голубцова³, А.В. Караулов⁴***ТРУДНОСТИ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ
АТОПИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ:
ВОЗМОЖНЫЕ ПОДХОДЫ К РЕШЕНИЮ**¹*Институт Аллергологии и Клинической Иммунологии, Москва*²*Центральная Районная Больница, Балашиха*³*ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина, Москва*⁴*Первый МГМУ им. Сеченова, Москва***Контактная информация***Григорьева Ирина Николаевна, врач-оториноларинголог***адрес:** 123104 Москва, ул.М. Бронная, 20, стр.1; тел. 8(495)695-56-95**e-mail:** i.n.grigorieva@gmail.com

Статья поступила 16.10.2014, принята к печати 24.11.2014.

Резюме

Широко известны стандартные методы диагностики atopических заболеваний верхних дыхательных путей, давно используемые в медицине. Но, к сожалению, существуют и диагностические трудности в лабораторной и клинической практике. Необходим простой и доступный метод для оценки начала atopического заболевания. Мы предлагаем выбрать определение назального иммуноглобулина Е (IgE) для дальнейшего широкого использования в связи с тем, что первично происходит контакт аллергенов со слизистой носа. Проведено изучение возможности измерения уровня назального IgE методом иммуноферментного анализа. 50 образцов для исследования получали с помощью стандартных способов (назальный аспират/назальный лаваж). Выявлено, что иммуноферментный анализ пригоден для оценки уровня назального IgE. Этот метод может стать важной составной частью будущего протокола диагностики с целью получения надежных результатов выявления иммунопатологических состояний, в том числе – локального аллергического ринита.

Ключевые слова: аллергический ринит, atopические заболевания, иммуноглобулин Е.*I.N. Grigorieva^{1,2}, I.V. Manina¹, N.V. Golubtsova³, A.V. Karaulov^{1,4}***PROBLEMS OF ATOPIC UPPER AIRWAY
DISEASES' DIAGNOSTICS
AND POSSIBLE APPROACHES TO SOLVE THEM**¹*Institute of Allergology and Clinical Immunology, Moscow*²*Central Regional Hospital, Balashikha*³*FSBSI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow*⁴*First Moscow Medical State University, Moscow***Abstract**

Standard methods of upper airway atopical diseases' diagnostics are well known and have been used for many years. But nevertheless there are several problems in laboratory and clinical practice. We need simple and objective tool to determine the primary onset of the disease. The contact of allergens with nasal mucosa leads to IgE production and we advise to measure locally-present IgE. The possibility of nasal IgE measurement was evaluated by means of immunosorbent assay. Nasal aspirate and nasal lavage as standard procedures of harvesting nasal secretions were used to obtain 50 samples. According to our results immunosorbent assay should be a simple approach for locally-present IgE measurement. This method could be an important part of future diagnostic procedure in order to receive reliable results in each case of atopical disorder including local allergic rhinitis.

Key words: allergic rhinitis, atopical disorders, IgE.**Введение**

Атопические заболевания – важная медико-социальная проблема современности. В настоящее время заболеваемость аллергическим ринитом возрастает во многих странах [9; 19; 27], в связи с чем актуально внедрение в практику новых современных методов диагностики, лечения и профилактики аллергических заболеваний и иммунодефицитных состояний.

Ученые продолжают активно исследовать иммунопатологические процессы развития

атопических заболеваний. Известен факт «атопического марша» или «атопической триады»: дерматит, ринит, бронхиальная астма. В связи с этим диагностика ринита как части иммунного ответа организма и триггера дальнейшего аллергического процесса со стороны дыхательных путей нуждается в тщательном изучении. Однако на данный момент все еще сохраняются сложности в его диагностике. Более того, важной также является возможность оценить риск возникновения первичной сенсибилизации организма после контакта с ингаляционным

аллергеном (то есть, определить группы риска по формированию аллергической патологии).

**Стандартные методы диагностики
атопических заболеваний
верхних дыхательных путей**

В соответствии с Федеральными Клиническими Рекомендациями по диагностике и лечению аллергического ринита, утвержденных президиумом РААКИ 23 декабря 2013 года, используются следующие способы лабораторной диагностики:

- общий анализ крови;
- цитологическое исследование секрета из полости носа на наличие эозинофилии;
- аллергологические исследования:
- кожные тесты с аллергенами,
- определение уровня общего и аллерген-специфических иммуноглобулинов E в сыворотке крови,
- провокационные назальные тесты с аллергенами.

Цитологическое исследование секрета из полости носа на наличие эозинофилии является технологически простым методом, доступным для проведения в широкой практике, однако его точность крайне низка.

Более специфичными являются провокационные способы диагностики аллергии (скарификационные/прикожные тесты и назальные тесты с аллергенами). Многие авторы считают кожные тесты наиболее чувствительным методом [10; 14; 24]. Однако проведение их может быть выполнено только аллергологом в специализированном кабинете при наличии возможности оказания реанимационных мероприятий.

Специалисты смежных дисциплин (оториноларингологи) не имеют возможности его применять в клинической практике. К тому же, исследование сопряжено с наличием противопоказаний (наличие острого воспалительного процесса различной этиологии, эмоциональная неустойчивость, гиперчувствительность кожи и слизистых, младенческий и пожилой возраст). Стандартные методы обследования не всегда позволяют в сложных случаях верифицировать диагноз. Зарубежные авторы дополнительно рекомендуют проводить исследование IgE в назальном секрете [17].

Определение IgE в назальном секрете относится к способам проведения иммунологического анализа, который не имеет противопоказаний такого рода и позволяет диагностировать аллергические изменения в слизистой носа.

Методы определения иммуноглобулинов

Для определения иммуноглобулинов в крови, секрете слизистых и в тканях используют иммунологические количественные и качественные методы диагностики [3; 4]. Среди качественных иммунологических методов диагностики распространены иммунофлуоресценция и иммуноцитохимия [5–7], что также может быть использовано и для выявления IgE в назальном секрете [13]. Используя метод иммунофлуоресценции, Reischner отметил, что назальный IgE может обладать большей диагностической ценностью, чем кожные тесты [22]. Автор проводил исследование на назальный IgE у 20 пациентов. В случае резко положительных кожных проб уровень общего и специфических назальных IgE был выше. В 8 случаях из 20 результаты кожных проб были отрицательными, а локальный IgE был обнаружен.

Имуноглобулины класса E являются медиаторами аллергических реакций немедленного типа. Рецепторы для IgE чаще всего несут базофильные и тучные клетки, которые содержатся в тканях (90 % в слизистых оболочках), обладают высокоаффинными Fc-рецепторами к IgE, содержат базофильные гранулы с ферментами острой фазы и большим количеством гистамина. В результате иммунной реакции антиген-антитело происходит деформация молекулы иммуноглобулина, которая вызывает цепную реакцию с дегрануляцией тучных клеток и базофилов, выделением гистамина, лейкотриенов и других медиаторов воспаления, вызывающих повышенную проницаемость сосудов, отек и повреждение тканей (это соответствует клинической картине аллергического заболевания).

Для диагностики аллергических заболеваний важным является не только выявление уровня антител класса IgE, но и количественная оценка уровня иммуноглобулинов для проведения дальнейших лечебных мероприятий. Среди количественных методов выделим РАСТ и метод ИФА, которые широко используются в лабораторной практике [2]. Диагностическая ценность очень высока и составляет 85–87 % [1].

Метод ИФА прекрасно себя зарекомендовал для оценки специфических иммуноглобулинов класса E в плазме (сыворотке) крови. Но определение IgE в плазме крови не всегда отражает уровень местной аллергии.

Показания для определения назального IgE

Следует отметить, что довольно часто выявляются ложноположительные результаты кожных тестов у людей, которые не отражают полную клиническую картину заболевания. Ранее для объяснения этого феномена предлагали понятие бессимптомной (латентной) сенсибилизации. В настоящее время при появлении тестирования на назальный IgE отмечены интересные результаты. Так, при проведении кожных тестов у 56 детей с аллергеном *Alternaria* в воздухе, только в 37,5 % случаев (у 20 детей) были получены положительные результаты тестирования на *Alternaria*. В то же время в назальном секрете IgE специфические были выявлены в 80,3 % (у 45 детей) случаев [16]. Известны клинические случаи, когда первичное и повторные диагностические тестирования показывают отрицательный результат у людей с симптомами аллергии. В связи с этим возникло предположение: существует вариант аллергического ринита, проявляющегося только местно, на слизистой носа. Этому феномену было дано название «локальный аллергический ринит» (ЛАР) или энтопия [20]. Концепция локального аллергического ринита была впервые сформулирована Brostoff и Huggins [18]. Многие клинические исследования и исследования *in vitro* свидетельствуют о том, что IgE продуцируется в слизистой носа и не может являться результатом обычной миграции из крови [13; 15; 18; 19; 21; 25; 26; 28]. Есть данные о том, в России в лаборатории А.Д. Адо выделяли такую форму АР еще в 1960-х гг. и называли его изолированным АР [11].

Мы считаем целесообразным в сложных случаях, при подозрении на сенсибилизацию к круглогодичным (бытовым и грибковым) аллергенам, а также при подозрении на ЛАР воспользоваться дополнительным методом обследования – определением назального IgE [8].

Схема, отражающая показания для исследования назального IgE, представлена на рис.



Рис. Диагностический алгоритм при обследовании на назальный IgE.

В настоящее время мы проводим стандартизацию метода диагностики назального IgE. В исследование включены пациенты с подтвержденным диагнозом “аллергический ринит” и проходящие специфическую иммунотерапию на базе Института Аллергологии и Клинической Иммунологии, а также пациенты, с клиническими симптомами аллергии, не подтвержденной стандартными методиками тестирования.

Методологические особенности определения назального иммуноглобулина E

Нами была поставлена задача модификации способа определения специфических IgE иммуноферментным анализом для повышения точности дифференциальной диагностики респираторных заболеваний верхних дыхательных путей. Данная задача осуществляется путем использования в качестве тестируемого материала назального секрета.

Для определения назального IgE методом иммуноферментного анализа использовались 50 образцов назального секрета. Нами апробированы следующие тест-системы: «Алкор-Био» (Россия) и «Allergozyme Total IgE 195 test» (ФРГ). Все они оказались приемлемы для работы с назальным секретом и могут быть в дальнейшем использованы для определения назального IgE.

Назальный секрет получали с помощью аспирации или назального смыва. Забор аспириата из носа проводили в стерильную сухую пробирку после предварительной анемизации без дополнительного усиления секреции с помощью гистамина. Использование метода провокации с гистамином¹ затрудняет проведение забора в амбулаторной практике в

связи с высоким риском побочных эффектов.

Полученные образцы до проведения анализа можно хранить при температуре +2–8 °С в течение 2 суток или в замороженном состоянии при температуре –20 °С в течение 2 месяцев. Для размораживания образцов их необходимо выдержать при комнатной температуре +20–25 °С не менее 60 минут.

Постановка ИФА проводится по стандартному протоколу. Для исследования используют образцы назального секрета в дубликатах по 10–20 мкл². Измерение оптической плотности раствора в лунках производят на фотометре вертикального сканирования. В наборе ИФА значения концентраций калибровочных проб выражены в МЕ/мл.

В настоящее время мы анализируем эффективность различных методов забора материала для исследования назального IgE, а именно сравнивая показатели:

1. назального аспириата,
2. назального смыва,
3. щеточной биопсии слизистой.

Для проведения щеточной биопсии слизистой используются стандартные щетки для биопсии тканей. Таким методом забора можно получить назальный секрет, эпителиальные клетки, тучные клетки, клетки Лангерганса [23]. Материал, полученный методом щеточной биопсии слизистой, переносят в стерильную пробирку с 2 мл физиологического раствора.

Для исследования образцов, полученных путем щеточной биопсии, полученные пробирки центрифугируют при 13 000 об/мин в течение 10 мин. Затем удаляют надосадочную жидкость, оставляя в пробирке около 50 мкл полученного раствора. Дальнейшая постановка реакции – по стандартному протоколу.

Минимальный выявленный уровень общего IgE в назальном секрете составил $D=0,53$ МЕ/мл, что соответствовало величине оптической плотно-

¹ Назальный смыв получали с помощью промывания полости носа физиологическим раствором в количестве 2 мл также после предварительной анемизации. Объем физиологического раствора для проведения промывания слизистой носа подобран экспериментально, что согласуется с техникой постановки реакции на наличие иммуноглобулинов в слюне [12].

² в зависимости от тест-системы.

сти, равной 0,050. Оптическая плотность образцов назального секрета, полученного путем смыва и аспирации, составила $0,050 \pm 0,227$. В случае результата $D < 0,050$ уровень IgE мы считали равным 0 МЕ/мл. Максимальный уровень IgE общего в назальном секрете, полученного путем смыва, составил 28,56 МЕ/мл, что соответствовало величине оптической плотности 0,227.

Полученные данные свидетельствуют о том, что методика ИФА может быть использована для проведения анализа на назальный IgE.

Выводы

Целесообразно рассматривать определение уровня назального IgE как один из дополнительных критериев диагностики atopических заболеваний

Литература

1. Аллергические болезни. Диагностика и лечение. Под ред. Р. Паттерсона. - М.: Гэотар Мед., 2000. - 733 с.
2. Барышников А.Ю., Караулов А.В., Черемушкин Е.А. и др. Динамика цитокинов у больных с диссеминированной меланомой в ходе вакцинотерапии аллогенными опухолевыми клетками // Российский биотерапевтический журнал. - 2009. - Т. 8, № 4. - С. 13-6.
3. Барышников А.Ю., Козлова М.В., Голенков А.К. и др. Клиническое значение анализа свободных легких цепей иммуноглобулинов сыворотки крови при множественной миеломе с различным ответом на химиотерапию // Российский биотерапевтический журнал. - 2007. - Т. 6, № 3. - С. 71-5.
4. Барышников А.Ю., Голенков А.К., Козарко И.Н. и др. Гаммапатии: Применение молекулярного иммунохимического метода определения свободных легких цепей иммуноглобулинов в сыворотке больных (часть 1) // Российский биотерапевтический журнал. - 2009. - Т. 8, № 1. - С. 75-80.
5. Бражник К.И., Барышников М.А., Соколова З.А. и др. Новые направления в исследовании и ранней диагностике рака с применением детекционных систем на основе флуоресцентных нанокристаллов // Российский биотерапевтический журнал. - 2013. - Т. 12, № 3. - С. 11-24.
6. Голубцова Н.В., Степанова Е.В., Бармашов А.Е. и др. Определение специфических противоопухолевых антител у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии // Российский биотерапевтический журнал. - 2012. - Т. 11, № 3. - С. 25-8.
7. Григорьева И.Н., Барышников А.Ю., Степанова Е.В. и др. Способность клеточных линий метастатической меланомы кожи к васкулогенной мимикрии // Российский биотерапевтический журнал. - 2010. - Т. 9, № 4. - С. 97-102.
8. Григорьева И.Н., Манина И.В., Голубцова Н.В., Сергеев А.Ю. Роль назального иммуноглобулина Е в диагностике atopических состояний // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2014. - в печати.
9. Манина И.В., Рыжих А.М., Стась Л.И. и др. Динамика показателей иммунной системы у пациентов с IgE-зависимым заболеванием на фоне специфической иммунотерапии // Российский биотерапевтический журнал. - 2012. - Т. 11, № 1. - С. 47-52.
10. Михайленко А.А., Майоров Р.В., Нусинов Е.В. Аллергодиагностика *in vivo* и *in vitro*: что предпочтительнее при аллергических заболеваниях дыхательных путей // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2010. - № 4. - С. 82-5.
11. Ненашева Н.М. Локальный аллергический ринит: миф или реальность? // Эффективная фармакотерапия. - 2013 - 20. - С. 8-16.
12. Титова Н.Д. Клиническое значение sIgA антител в слюне к пищевым добавкам у детей с аллергическими заболеваниями // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2011. - № 2 - С. 63-9.
13. Cameron L., Gounni A.S., Frenkel S. et al. S epsilon S mu and S epsilon S gamma switch circles in human nasal mucosa following ex vivo allergen challenge: evidence for direct as well as sequential class switch recombination // Journal of Immunology. - 2003. - 171. - P. 3816-22.
14. Dreborg S. Allergy diagnosis. En: Mygind N.N., editors. Allergic and non-allergic rhinitis. Clinical aspects. - Copenhagen: Munksgaard; 1993. - P. 82-94.
15. Fiset P.O., Cameron L., Hamid Q. Local isotype switching to IgE in airway mucosa // Journal of Allergy and Clinical Immunology. - 2005. - 116. - P. 233-6.
16. Fuiano N., Fusilli S., Incorvaia C. A role for measurement of nasal IgE antibodies in diagnosis of Alternaria-induced rhinitis in children // Allergy and Immunopathology (Madrid). - 2012. - 40. - P. 71-4.
17. Garas G., Jones N. Is there a role for measurement of nasal IgE antibodies in diagnosis of Alternaria-induced rhinitis in children? // Allergy and Immunopathology (Madrid). - 2012. - 40. - P. 69-70.
18. Huggins K.G., Brostoff J. Local production of specific IgE antibodies in allergic-rhinitis patients with negative skin tests // Lancet. - 1975. - 2. - P. 148-50.
19. Maziak W., Behrens T., Brasky T.M. et al. Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase III surveys in Munster, Germany // Allergy. - 2003. - 58. - P. 572-9.
20. Powe D., Mason M., Jagger C. et al. "Entopy": localised mucosal allergic disease in the absence of systemic responses for atopy // Clinical and Experimental Allergy. - 2003. - 33. - P. 1374-9.
21. Powe D.G., Bonnini A.J., Jones N.S. "Entopy": local allergy paradigm // Clinical and Experimental Allergy. - 2010. - 40. - P. 987-97.
22. Reisacher W.R. Mucosal brush biopsy testing of the inferior turbinate to detect local, antigen-specific immunoglobulin E // International Forum of Allergy and Rhinology. - 2012. - 2(1). - P. 69-74.
23. Reisacher W.R., Blemberg M.G. Prevalence of antigen-specific IgE on mucosal brush biopsy of the inferior turbinates in patients with nonallergic rhinitis // International Forum of Allergy and Rhinology. - 2014. - 4(4). - P. 292-6.
24. Shyur S.D., Jan R.L., Webster J.R. et al. Determination of multiple allergen-specific IgE by microfluidic immunoassay cartridge in clinical settings // Pediatric Allergy and Immunology. - 2010. - 21. - P. 623-33.
25. Smurthwaite L., Durham S.R. Local IgE synthesis in allergic rhinitis and asthma // Current Allergy and Asthma Reports. - 2002. - 2. - P. 231-8.
26. Takhar P., Smurthwaite L., Coker H.A. et al. Allergen drives class switching to IgE in the nasal mucosa in allergic rhinitis // Journal of Immunology. - 2005. - 174. - P. 5024-32.
27. Von Mutius E., Weiland S.K., Fritsch C. et al. Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany // Lancet. - 1998. - 351. - P. 862-6.
28. Zurcher A.W., Derer T., Lang A.B., Stadler B.M. Culture and IgE synthesis of nasal B cells // International Archives of Allergy and Immunology. - 1996. - 111. - P. 77-82.

СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АР	– аллергический ринит
ИФА	– иммуноферментный анализ
ЛАР	– локальный аллергический ринит
РАСТ	– радиоаллергосорбентный тест

УДК 576.367:577.352.2:547.495.4

*П.В. Гольшко***МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ АНТИАНГИОГЕННОЙ ТЕРАПИИ***ГКБ № 57, Москва***Контактная информация***Павел Викторович Гольшко, заведующий 6 онкологическим отделением ГКБ 57***адрес:** 105077, Москва, 11 Парковая ул. 32; тел. +7 (495) 305-23-05**e-mail:** golp@tut.by

Статья поступила 10.09.2014, принята к печати 24.11.2014.

Резюме

Четыре десятилетия назад неоангиогенез был определен как терапевтическая мишень для блокады злокачественного роста. Оценка ангиогенеза опухоли рассматривается как один из самых успешных маркеров прогноза течения заболевания, наличия метастазов и чувствительности к противоопухолевой терапии. VEGF был центральной фигурой в антиангиогенной терапии. После появления таргетных МКА против VEGF в качестве первого антиангиогенного препарата, много пациенток с злокачественными заболеваниями и неоваскуляризацией глаз подверглись анти-VEGF терапии. Однако эта стратегия оказалась недостаточно эффективна. У больных развивалась резистентность к препарату и метастазирование. Недавно были открыты новые механизмы неоангиогенеза и новые антиангиогенные препараты, которые обсуждаются в настоящем обзоре.

Ключевые слова: ангиогенез, молекулярные мишени, терапия.*P.V. Golyshko***MOLECULAR TARGETS OF THE ANTI-ANGIOGENIC THERAPY***Hospital № 57, Moscow***Abstract**

Four decades ago, angiogenesis was identified as a therapeutic target to block malignant tumor growth and evaluation of tumor angiogenesis is now regarded as one of the most successful predictor of disease, presence of metastases, and sensitivity to anticancer therapy. VEGF was a central figure in the anti-angiogenic therapy. From the moment when the target monoclonal VEGF antibodies as the first anti-angiogenic drug were derived, many patients with malignant tumors and retinal neovascularization underwent anti-VEGF therapy.

However, this strategy was not effective enough. Patients obtained drug resistance and metastasis growth. Recently new mechanisms neoangiogenesis were opened and new anti-angiogenic agents are discussed in this article.

Key words: angiogenesis, molecular targets, therapy.**Введение**

Ангиогенез – образование новых кровеносных сосудов из предсуществующих; является незаменимым, комплексным и динамичным процессом, важным в патогенезе злокачественных, инфекционных и воспалительных заболеваний. Образование новых сосудов из предсуществующих капилляров требует реализации ряда последовательных событий, которые являются ключевыми в физиологических и патологических процессах. Рост нормальных тканей – развитие эмбриона, заживление раны и менструальный цикл – характеризуются образованием новых сосудов для обеспечения кислородом и питательными веществами, для элиминации отходов. При различных заболеваниях – инфаркте миокарда или иных тканей, атеросклерозе, ревматоидном артрите, диабетической ретинопатии, псориазе, болезни Крона – носит нефизиологический характер. Исход этих заболеваний может улучшаться при антиангиогенной терапии.

Ангиогенез в опухоли впервые был описан сто лет тому назад. В 1971 году J. Folkman показал, что опухоль не может расти больше 2 мм в ϕ и предположил, что рост опухоли и метастазирование зависят от ангиогенеза, а блокада ангиогенеза может стать стратегией в терапии злокачественных новообразований [87]. Затем было убедительно показано, что при канцерогенезе ткани приобрета-

ют ангиогенный потенциал. Ядро опухолевого узла быстро подвергается гипоксии. Опухолевые клетки начинают продуцировать проангиогенные факторы, ответственные за рост и миграцию эндотелиальных клеток. В результате образуется новая сосудистая сеть, обеспечивающая опухоль кислородом, питанием, ростовыми факторами, протеолитическими ферментами и факторами, секретируемыми опухолевыми клетками, обеспечивающими диссеминацию процесса [72; 73; 46]. Ангиогенез и гипоксия являются отличительной чертой солидных опухолей [107; 136]. Существует баланс между проангиогенными и антиангиогенными молекулами необходимыми для неоангиогенеза. Однако в опухоли он нарушен в пользу проангиогенных факторов.

Эндотелиальные клетки

Эндотелиальные клетки, выстилающие кровеносный сосуд, играют основную роль в выполнении ангиогенеза. После инициации ангиогенеза в эндотелиальных клетках под действием проангиогенных стимулов происходит: синтез протеаз, которые деградируют внеклеточный матрикс; миграция под действием стимулов; пролиферация эндотелиальных клеток для увеличения их количества.

Активация эндотелиальных клеток к миграции из места их постоянной локализации является процессом, требующим поляризации эндотелиальных клеток и трансмиграции через базальную мем-

брану в окружающий матрикс. Для последнего этапа требуется активация протеолитической деградации матриксных белков, плазминогенной системы, матрикс-металлопротеазной системы, гепариназы и др [130]. Большая роль в процессе опухолевого ангиогенеза отводится урокиназо-плазминогенной системе. Ингибирование функционирования этой системы значительно снижает инвазивные потенции эндотелиальных клеток [119].

Пролиферация эндотелиальных клеток во вновь образующихся кровеносных сосудах опухоли не успевает за быстрым ростом сосудов и в них образуются поры размером до 700 нм, в которые могут проникать наночастицы, в том числе и липосомы [19]. Липосомы проникают в опухоль и застревают в строме [6; 7; 17 – 19]. Липосомы малых размеров могут снова выходить в кровоток. Этот феномен называется «эффект проникновения и накопления» [49–52]. В связи с этим дефектом в кровеносных сосудах липосомы рассматриваются как перспективное средство доставки противоопухолевых препаратов в опухоль [23; 24; 26; 27; 31; 40–45; 54–56; 63; 64; 66; 78; 103].

Опухолевое микроокружение

Долгое время считалось, что опухолевые клетки являются главным источником ангиогенных факторов [61; 62; 99]. Однако появилось большое количество доказательств, что опухолевое микроокружение, которое состоит из фибробластов, перидитов, мезенхимальных стволовых клеток, воспалительных и иммунных клеток, также влияет на ангиогенез посредством секреции проангиогенных молекул [60; 93; 77; 110]. Инфильтрирующие опухоль фибробласты усиливают ангиогенез через экспрессию стромального клеточного фактора 1 (SDF-1)¹. Инфильтрирующие опухоль фибробласты от больных, леченых анти-VEGF, могут индуцировать ангиогенез независимо от VEGF [75]. Инфильтрирующие опухоль лимфоциты играют важную роль в ангиогенезе на ранних этапах развития опухоли [98].

Антиангиогенная терапия угнетает и нормализует васкуляризацию опухоли, но повышает внутриопухолевую гипоксию [79; 96; 104; 117]. Гипоксия и гипоксия-индуцирующий фактор-1 (HIF-1) появляются также при резистентности опухоли возникшей после радио- и химиотерапии. Гипоксия способствует инвазии, метастазированию и обуславливают плохой прогноз солидных опухолей [20; 21; 29; 30; 38]. Фактор HIF-1 рассматривают как главный регулятор ангиогенеза. Он регулирует большое число генов, вовлеченных в ангиогенез, пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, рекрутирование перидитов и модификацию сосудистой проницаемости [121].

Гипоксия вызывает миграцию в опухоль из костного мозга предшественников эндотелиальных клеток и перидитов, опухоль-инфильтрирующих макрофагов, юных моноцитов и миелоидных клеток, которые продуцируют большое количество различных проангиогенных факторов и могут рассматриваться как дополнительный адаптивный механизм к кислородному голоданию. Большое внимание уделяется миелоидным супрессорам. Это клетки с иммунологическим фенотипом CD11b⁺Gr1⁺, их титр повышается в крови и селезенке онкологических больных [97]. Инвазия опухоли миелоидными клет-

ками ассоциирована с ростом новообразования и прогрессией, а также с развитием резистентности к анти-VEGF терапии [124].

Опухолевые и стромальные клетки секретируют ИЛ-6, SDF-1 α , G-CSF, которые активируют и мобилизуют CD11b⁺Gr1⁺-клетки [108]. Экспрессия G-CSF опухолевыми или стромальными клетками является решающей для устойчивости к анти-VEGF терапии [124]. Более того, у больных леченных ингибиторами тирозинкиназ, такими как Сорафениб, Сунитиниб, Бевацизумаб плюс химиотерапия, развивается нейтропения [80; 123]. Таким образом, лечение Г-КСФ вызывает мобилизацию в опухоль предшественников эндотелиальных клеток и миелоидные супрессоры CD11b⁺Gr1⁺.

Экспрессия SDF-1 α эндотелиальными клетками повышается под влиянием HIF-1 в условиях гипоксии. Костномозговые предшественники, экспрессирующие рецептор фактора HIF-1 цитокин CXCR4, рекрутируются в ишемические ткани путем тропизма к SDF-1 α . Повышение SDF-1 α связано с антиангиогенной терапией у больных глиомой. При лечении Сунитибом уровень SDF-1 α повышался дозо-зависимым образом.

Перидиты принадлежат к линии клеток гладкой мускулатуры сосудов. Существует два типа перидитов – тип-1 и тип-2. Перидиты первого типа выявляются в нормальных кровеносных сосудах, а перидиты второго типа – в опухолевых [72]. Они секретируют паракринные факторы, которые стимулируют сигнальные пути в эндотелиальных клетках, способствующие созреванию и выживанию. Эти клетки важны для развития сосудов, подвижности эндотелиальных клеток и сосудистой стабильности.

Антиангиогенная терапия приводит к деструкции 80 % опухолевых сосудов. Образование новых сосудов прекращается, а в некоторых сосудах кровотока останавливается [76]. Ингибирование VEGF-сигнального пути индуцирует апоптоз и/или селекцию эндотелиальных клеток с меньшей экспрессией VEGFR-2 рецептора. Угнетение экспрессии VEGFR обратимо.

Типы ангиогенеза

Поддержание роста опухоли требует постоянной доставки кислорода и питательных веществ. Для этого необходима хорошо развитая сосудистая сеть, которая формируется за счет развития существующих сосудов, образования новых сосудов или рекрутирования предшественников эндотелиальных клеток из костного мозга. Образующиеся в опухоли сосуды оказываются неполноценными как в структурном, так и в функциональном отношении. Кровеносные сосуды в опухоли не гомогенны по своей структуре, степени созревания и природы [125]. Стенки сосуда легко проницаемы, извилисты, расширены и часто сообщаются между собой случайными шунтами. В опухоли образуются следующие типы сосудов:

- отростковый ангиогенез [111];
- васкулогенная мимикрия [81; 132 – 135];
- васкулогенное вовлечение клеток-предшественников [129].

Васкулогенная мимикрия представляет собой процесс формирования кровеносных сосудов опухолевыми клетками без участия эндотелиальных клеток и фибробластов, содержащих форменные элементы крови и участвующих в кровоснабжении опухоли [14 – 16; 132 – 134]. Определение *in vitro* в опухолевой ткани структур васкулогенной мимик-

¹Этот фактор рекрутирует предшественники эндотелиальных клеток в опухоль и усиливает опухолевый рост [114].

рии основано на окрашивании базальной мембраны реактивом Шиффа (PAS).

Эндотелиальные клетки, выстилающие кровеносные сосуды в опухоли, морфологически повреждены. Перициты, поддерживающие эндотелий, разрыхлены или отсутствуют. Базальная мембрана утолщена или отсутствует.

В связи с этим кровоток в опухоли становится дезорганизованным и неравномерным [67]. Кроме того, безудержно пролиферирующие опухолевые клетки дополнительно оказывают давление на кровеносные и лимфатические сосуды.

Ангиогенез и метастазирование

Возникновение метастазов – основная причина смертности онкологических больных [2; 91]. В связи с этим идентификация маркеров, тесно связанных с метастатическим потенциалом каждой отдельной опухоли, необходима для планирования противоопухолевой терапии. Появляется все больше доказательств, что метастазирование зависит от степени васкуляризации опухоли [30]. При метастазировании гематогенным путем опухолевые клетки должны прикрепиться к эндотелиальным клеткам, пройти в просвет сосуда, выжить в циркулирующей крови, остановиться в какой-либо отдаленной ткани и образовать там колонию. Высокоангиогенные первичные опухоли с большой внутриопухолевой плотностью сосудов обладают большей способностью дать в отдаленном органе клон, который при благоприятных условиях образует метастаз. В 77 % исследований нашли, что высокая степень васкуляризации опухоли является статистически значимым маркером наличия метастазов в регионарных лимфатических узлах. Также в 77 % исследований обнаружена связь между опухолевым ангиогенезом и развитием отдаленных метастазов [61; 90].

Большую роль в образовании новых сосудов и метастазировании играет гиалуроновая кислота и ее лиганд антиген CD44. Гиалуроновая кислота – глюкозаминогликан с большой молекулярной массой. Она является рецептором для антигена CD44. Этот комплекс ответственен за инвазию опухолевых клеток через стенку кровеносных сосудов и является регулятором пролиферации клеток, выживания и блокаду апоптоза.

VEGF

Центральную роль в ангиогенезе играет сигнальная молекула VEGF [8; 95]. Различные стимулы ответственны за продукцию VEGF. Среди них гипоксия стала известна первой [69]. Существуют два типа рецепторов, VEGF-1 и VEGF-2, которые являются тирозинкиназами III типа. Они имеют цитоплазматический C-концевой домен, трансмембранный домен и большой внеклеточный участок, состоящий из 7 Ig-подобных доменов. Рецепторы VEGFR-1 и VEGFR-2 обладают высокой гомологией. Однако, VEGFR-1 значительно сильнее связывается с VEGF, хотя его тирозинкиназная активность относительно низка.

VEGF является проангиогенным фактором и действует на всех этапах ангиогенеза [112; 115]. Рецептор усиливает сосудистую проницаемость, позволяющую белкам плазмы вытекать из сосудов и образовывать ложе для прикрепления эндотелиальных клеток. Рецептор VEGF усиливает пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, их инвазию в окружающие ткани и образование капилляроподобных структур. В связи с этим, VEGF-

А считают главным регулятором физиологического и патологического ангиогенеза [8; 9; 28; 65] При физиологических условиях VEGF регулируется гипоксией через связывание HIF с его промотером. VEGF гиперэкспрессирован в большом количестве опухолей [127]. VEGF-A специфически связывается с эндотелиальными клетками через VEGFR-1 (flt-1) и VEGFR-2 (flk-1) рецепторы. Недавно было показано, что VEGF также связывается с нейрофилином-1 или нейрофилином-2, что усиливает сигнал для миграции эндотелиальных клеток.

В клинике используются различные ингибиторы VEGF и VEGFR [105; 106]. Среди них блокирующие антитела Бевацизумаб (Avastin, Genentech), а также малые молекулы ингибирующие тирозинкиназу VEGFR-2, такие как sorafenib, sunitinib, pazopanib. Антиангиогенная терапия показала увеличение времени до прогрессирования, общей выживаемости и улучшение объективных ответов у больных раком почки, немелкоклеточным раком легких, раком яичников и колоректальным раком [94; 103]. Однако не у всех больных был благоприятный ответ на антиангиогенную терапию, так как больные становились резистентными к терапии, основанной на VEGF, и рецидивировали [86]. Появились убедительные доказательства, что блокада VEGF/VEGFR-2 сигнального пути приводит к повышенной регуляции других молекул, которые поддерживают образование новых сосудов [61]. Ангиогенное насыщение было первым идентифицированным механизмом резистентности к анти-VEGF терапии [29]. При насыщении антиангиогенными факторами могут продуцироваться другие факторы, включая FGFs, PDGF, TNF-alpha.

TSP-1 (тромбоспондин)

Тромбоспондин – один из главных ингибиторов ангиогенеза, влияющих на адгезию и рост эндотелиальных клеток [68; 116]. Это гликопротеин экстрацеллюлярного матрикса, синтезируемый различными типами клеток, в том числе эндотелиальными и некоторыми опухолевыми. Он играет важную роль в агрегации тромбоцитов и регулирует адгезию и пролиферацию эндотелиальных клеток. Показано, что синтез тромбоспондина контролируется нормальным белком p53 и часто в опухолевых клетках с мутантным p53 нарушен синтез тромбоспондина. Тромбоспондин является большим гликопротеидом кодируемым геном *THSBI*, который участвует в передаче клеточных сигналов, в заживлении ран и ангиогенезе. Физиологической функцией TSP-1 является ингибция ангиогенеза. Иммуногистохимически тромбоспонтин определяется в перитубулярной соединительной ткани и в базальной мембране кожи, в легком и нормальных кровеносных сосудах. Также наблюдается сильное окрашивание базальных мембран и среднее в прилежащих к строме опухолевых клеток в большинстве случаев инфильтрирующего рака молочной железы. Хорошо изучено влияние TSP-1 на ангиогенез. Угнетение экспрессии TSP-1 обычно ассоциирует с агрессивным ангиогенезом и усилением роста опухоли. Усиление экспрессии TSP-1 ассоциировано с угнетением роста опухоли и уменьшением плотности кровеносных сосудов. В течение развития опухоли экспрессия TSP-1 коррелирует с проангиогенным фактором VEGF.

bFGF-2 (Фактор роста фибробластов)

Семейство факторов роста фибробластов (bFGF) влияет на ангиогенез, нейрогенез, развитие

органов и морфогенез [102]. FGF-2 связывается с их рецептом FGFR-1. Имеются доказательства, что FGF-1 и FGF-2 способны влиять на ангиогенез независимо от VEGF и приводить к снижению опухолевого ангиогенеза [74; 120]. Экспрессия bFGF определяется в 70 % НМРЛ. Однако связь между его экспрессией и прогностической значимостью противоречива. В клинических исследованиях было показано, что блокаторы FGF-2 талидомид или сурамин оказывают терапевтический эффект у больных РПЖ и почечноклеточным раком [70].

PDGF

PDGF, высоко экспрессированный в опухолях, усиливает ангиогенез и метастазирование в легкие [102]. Фактор роста фибробластов FGF-2 усиливает в эндотелиальных клетках экспрессию PDGFR и они приобретают гиперчувствительность к PDGF-BB. Было показано, что повышение экспрессии PDGF-BB угнетает рост колоректальной опухоли и рака поджелудочной железы через повышение содержания пеницинов в опухолевом микроокружении.

Семейство Delta/Jagged

Дельта I-подобный лиганд 4 (DII4) является членом семейства Delta/Jagged трансмембранных лигандов, связывающихся с Notch-рецептором. Delta-Notch-сигнальный путь может не только влиять на регуляцию артерио-венозной дифференцировки, но также способен стимулировать образование кровеносных сосудов. Кроме того, он опосредует клеточно-клеточное взаимоотношение и играет важную роль в определении размера образующихся кровеносных сосудов [100]. Ингибиторы DII4 могут быть новым терапевтическим инструментом при резистентности опухоли к ингибиторам VEGF/VEGFR [131]

Система ангиопоэтина

Ангиопоэтин инициирует сигнальную систему через собственный рецептор Tie2. Ангиопоэтин защищает PI3K сигнальный путь, посылая сигналы выживания. Роль ангиопоэтина 2 в ангиогенезе заключается в том, что он антагонист ангиопоэтина 1 и ингибирует усиленный ангиопоэтином 1 Tie2 сигналинг, который является критическим для созревания и стабилизации кровеносных сосудов. Роль ангиопоэтина 2 в ангиогенезе опухолей дискуссионная. Усиление ангиопоэтина 2 коррелирует со злокачественностью различных опухолей у человека. В эксперименте на мышах показано, что усиление ангиопоэтина 2 вызывает усиление ангиогенеза и роста опухоли. Хотя в других исследованиях показано, что специфическая индукция ангиопоэтина 2 вызывает угнетение роста и метастазирования глиомы, опухолей рака молочной железы и карциномы легких [95].

CD36

Антиген CD36 – мультилигандный гликопротеиновый рецептор, связывающий TSP-1. Антиген CD36 работает как транспортер и сенсор свободных жирных кислот. Он прокачивает в клетку большое количество факторов и участвует в процессе интернализации и патогенезе различных липопротеинов. Антиген CD36 является интегрированным в плазматическую мембрану белком с ММ 88 кД и экспрессированным на различных клетках, включая тромбоциты, эритроциты, эндотелиальные и опухолевые клетки. Одной из хорошо изученных

функций CD36 рецептора является ингибция ангиогенеза путем связывания TSP-1 TSP-2. После связывания рецепторов CD36 инициирует антиангиогенный сигнальный путь в эндотелиальных клетках, приводящий к апоптозу. Связывание CD36 с TSP рекрутирует протеинкиназы fyn, lyn, yes в CD36 комплекс. Результатом образовавшегося комплекса является активация киназ и инициация p38 сигнального пути протеинкиназы (MAPK), активация эффекторной каспазы 3 и гибель клетки путем апоптоза. Рецепторы CD36, TSP-1 и VEGF расположены рядом на цитоплазматической мембране и напрямую взаимодействуют друг с другом [82; 84; 115; 118].

Тканевой фактор

(TF, коагуляционный фактор III, тромбопластин, CD142)

Тканевой фактор является первичным активатором каскада коагуляции в ответ на повреждение [73]. Кроме того, он играет роль прокоагулянтного фактора и участвует в метастазировании опухоли. Активация каскада коагуляции приводит к образованию тромба, что наиболее связано с онкологией. Гиперкоагуляция присутствует в большинстве опухолей и участвует в опухолевом росте и метастазировании. У многих онкологических больных имеется гиперкоагуляция, которая является серьезным осложнением, приводящем к тромбозу. Тканевой фактор регулируется в моноцитах, макрофагах и эндотелиальных клетках с помощью ростовых факторов и цитокинов.

Адгезионные молекулы интегрин и их роль в ангиогенезе

Рецепторы адгезии интегрин – гетерогенные молекулы, которые обеспечивают взаимодействие клеток с матриксом [10–13; 22; 37]. Они влияют на клеточную миграцию, пролиферацию, дифференцировку и выживание [32–36; 46; 47; 53; 83]. Через интегрины индуцируются основные сигнальные пути, которые регулируют инвазию опухолевых клеток, метастазирование и усиление ангиогенеза. Активация и повышение экспрессии некоторых адгезионных молекул коррелирует с прогрессией злокачественных опухолей [122; 128]. Миграция эндотелиальных клеток регулируется интегринами [68].

Интегрины функционируют как молекулы, передающие сигналы от клетки к матриксу и наоборот. Два цитокиновых пути влияют на интегрин-зависимый ангиогенез. Первый индуцируется или FGF, или TNF- α , а второй инициируется фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) или трансформирующим фактором роста. Антагонисты интегринов исследуются на пригодность в терапии опухолей [71].

Антитела, блокирующие связывание витронектина и фибриногена, предотвращают адгезию, миграцию, пролиферацию и опосредованный интегринами клеточный сигналинг дозозависимым образом. В связи с тем, что интегрины регулируют ангиогенез, были получены человеческие моноклональные антитела, названные CNNO 95.

Предварительные результаты показали угнетение ангиогенеза и роста ксенотрансплантатов человеческой меланомы кожи у голых мышей.

В I/II фазах клинических испытаний этих антител у больных меланомой кожи показано, что они блокируют ангиогенез, инвазию и метастазирование [113].

Клинические аспекты неоангиогенеза**Оценка ангиогенеза**

Оценка ангиогенеза рассматривается как один из самых успешных маркеров прогноза течения заболевания, наличия метастазов и чувствительности к противоопухолевой терапии. Клиническая значимость определения количества сосудов в опухоли показана для новообразований различных типов. Обнаружена зависимость: чем выше плотность сосудов, тем хуже прогноз у пациентов [88; 89].

Широко используемым методом оценки ангиогенеза опухоли является подсчет микрососудов в первичной опухоли с помощью специфических маркеров эндотелиальных клеток (VEGF, PDGF, VIII фактор, АГ CD31 и CD34, стандартная иммунопероксидазная техника окраски сосудов [53; 61; 137]).

Плотность микрососудов опухоли как прогностический маркер полностью отвечает требованию по следующим причинам.

1. Ангиогенез необходим для перехода от преинвазивной (карцинома *in situ*) к инвазивной стадии первичной опухоли.
2. В инвазивных опухолях, даже одинакового гистологического типа, ангиогенная активность различается. По степени ангиогенной активности больных можно разделить на ряд категорий.
3. Плотность микрососудов опухоли не связана с экспрессией некоторых других молекулярно-биологических маркеров, включая p53, HER2/neu, EGFR.
4. Высокая ангиогенная активность опухоли способствует развитию местных и отдаленных метастазов [126].

Ингибция ангиогенеза

Рациональная идея целесообразности разработки средств и методов нарушения васкуляризации опухолей, высказанная J. Folkman, легла в основу новых подходов к лечению рака, обозначенных как антиангиогенная терапия. Эти принципы привлекли многих исследователей к поиску новых антиангиогенных препаратов. Ингибцию ангиогенеза в опухоли можно вызвать несколькими способами:

1. Нейтрализация ангиогенных факторов. Ингибиторы VEGF были первыми антиангиогенными препаратами, которые показали перспективны и неудачи антиангиогенной терапии.
2. Ингибция VEGF-рецептора.
3. Блокада иницированного VEGF сигнального пути ингибиторами тирозинкиназ SU5416 и PTK787.
4. Ингибция матриксных металлопротеаз препаратами marimastat и prinomastat.
5. Ингибция адгезии эндотелиальных клеток (антитела Vitaxin против интегрина $\alpha_5\beta_3$).
6. Ингибция миграции эндотелиальных клеток интерфероном альфа.
7. Ингибция пролиферации эндотелиальных клеток (TNP-470, ангиостатин, эндостатин, ангинекс).

Многие антиангиогенные препараты для лечения злокачественных заболеваний хорошо проявили себя в опытах на экспериментальных животных, однако в клинике были получены разочарывающие результаты.

В связи с этим является актуальным поиск новых ингибиторов неоангиогенеза [85].

В настоящее время в клинической практике используются и изучаются следующие перспективные препараты, которые направлены на вышеуказанные пути ингибции ангиогенеза:

Бевацизумаб (Avastin) – гуманизированные моноклональные антитела применяются для лечения колоректального рака, рака почки и рака легких.

Эверолимус (Everolimus; Afinitor) – используется для лечения рака почки, астроцитомы и нейроэндокринных опухолей.

Леналидомид (Lenalidomide; Revlimid) – используется для лечения хронического миелолейкоза, миелодиспластического синдрома, множественной миеломы и мантийноклеточной лимфомы – проявляет антиангиогенную активность при этих опухолях.

Пазопамид (Pazopamid, Votrient) – применяется при лечении рака почки и саркомы мягких тканей.

Рамусирумаб (Ramucirumab, Cyramza) – используется в терапии рака желудка и гастроэзофагальной аденокарциномы.

Сорафениб (Nexavar) – применяется при раке почки, раке печени и щитовидной железы.

Сунитиниб (Sutent) – используется в лечении рака почки, при нейроэндокринных опухолях и опухолях желудочно-кишечного тракта.

Талидомид (Thalidomide, Thalimid) – помимо иммуномоделирующего действия талидомид ингибирует активацию эндотелиальных клеток через VEGF, FGF-2 и другие рецепторы. У больных множественной миеломой талидомид угнетает секрецию VEGF костно-мозговыми эндотелиальными клетками. Получены хорошие результаты при лечении талидомидом рефрактерных множественной миеломой и раком предстательной железы. Кроме того, обнаружили, что талидомид ингибирует NF κ B сигнальный путь, который играет важную роль при раке предстательной железы.

Афлиберсен/Афлиберсепт – является сливным белком с гомологичными последовательностями нативных VEGFR-1 и VEGFR-2 рецепторов и специфически связывается с некоторыми вариантами VEGF. Клинические исследования препарата показали его эффективность в комбинации с иринотеканом и 5-фторурацилом у больных метастатическим колоректальным раком.

Vandetanib – оральные ингибиторы RET-киназы, EGFR- и VEGFR-сигнальных путей. Препарат показал обнадеживающие результаты при раке молочной железы, немелкоклеточного рака легких.

Cilengitide – ингибитор интегринов, продемонстрировал хорошие результаты при лечении глиобластомы, рака молочной железы, немелкоклеточного рака легких. Препарат способен откреплять клетки от матрикса, снижает пролиферацию и рост клеток, блокирует FAK-Src-Akt- и Erk-сигнальные пути.

Ангиостатин и эндостатин. Эндогенные ингибиторы ангиогенеза ангиостатин, плазмин и эндостатин происходят из коллагена XVIII типа. Они используются для ингибции ангиогенеза множество сигнальных путей. Использование их в качестве ингибитора опухолевого ангиогенеза показало многообещающие результаты в опытах на мышах. Эндостатин известен также как ингибитор лимфоангиогенеза. Эндостатин ингибирует экспрессию VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D. Эндостар – рекомбинантный человеческий эндостатин. Он связывается с рецептором VEGF на сосудистых эпителиальных клетках в опухоли и ингибирует опухолевый ангиогенез, а также блокирует питание опухоли:

Razoranib – По результатам I и II фазы клинических испытаний заключили, что препарат дает хорошие результаты у больных раком почки.

Neamine – эффективный ингибитор прогрессии орального рака посредством ингибции ангиогенеза. Препарат также напрямую ингибирует пролиферацию опухолевых клеток.

Кроме того, антиангиогенное действие обнаружили в экстрактах из некоторых лекарственных растений [39; 58; 59; 92; 109].

Идет поиск химических соединений с антиангиогенным эффектом [139].

Универсальным средством доставки противоопухолевых препаратов к эндотелию сосудов являются иммунолипосомы. Моноклональные антитела или лиганды, прикрепленные к поверхности

липосом, специфически связываются с эндотелиальными клетками и доставляют препарат в клетку [1, 3, 4, 7, 25, 42, 48, 64]

Заключение

40-летний опыт изучения неоангиогенеза и попытки лечения злокачественных опухолей антиангиогенными препаратами показали, что возникающая при лечении гипоксия в опухоли индуцирует новые факторы, стимулирующие ангиогенез и метастазирование.

Стало ясно, что одними антиангиогенными препаратами добиться полного излечения опухоли невозможно; необходима комбинация с другими традиционными и новыми методами терапии.

Литература

1. Алексеева А.С., Апкаева М.Р., Щегловитова О.Н. и др. Специфическое связывание и накопление в эндотелиальных клетках цитотоксических липосом с лигандом селектинов сиалил-Льюис-X // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 58.
2. Антонов М.В., Сабиров А.Х., Сабиров Т.М. и др. Значение молекулярно-биологических маркеров при лечении больных колоректальным раком таргетными препаратами // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 3. – С. 47–52.
3. Барышников А.Ю., Оборотова Н.А. Иммунолипосомы – новое средство доставки лекарственных препаратов // Современная онкология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 4.
4. Барышникова М.А., Барышников А.Ю. Иммунолипосомы и мишени их действия // Российский химический журнал. Журнал Российского химического общества им. Д.И.Менделеева 2012. – Т. LVI, № 3–4. – С. 60–7.
5. Барышникова М.А., Грищенко Н.В., Бурова О.С. и др. Роль CD95/Fas рецептора в индукции апоптоза противоопухолевыми препаратами // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 3–8.
6. Барышникова М.А., Грищенко Н.В., Полозкова А.П. Влияние лекарственных форм аранозы на индукцию апоптоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 64.
7. Барышникова М.А., Зангеева М.Т., Барышников А.Ю. Взаимодействие липидных капсул с клеткой // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 11–5.
8. Березов Т.Т., Овчинникова Л.К., Кузнецова О.М. и др. Фактор роста эндотелия сосудов в сыворотке крови больных раком молочной железы // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 95–9.
9. Блохин Д.Ю., Чмутин Е.Ф., Иванов П.К. Молекулярные мишени для противоопухолевой терапии: факторы роста, ангиогенеза и апоптоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 25–30.
10. Боценовский В.А., Барышников А.Ю. Молекулы клеточной адгезии // Успехи современной биологии. – 1994. – Т. 114, № 6. – С. 741.
11. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Ильенко В.А. и др. Экспрессия лейкоцитарных интегринов и некоторых циткинов при использовании фитоадаптогена у высококачественных мышей // Технологии живых систем. – 2012. – Т. 9, № 3. – С. 13–7.
12. Бочарова О.А., Серебрякова Р.В., Голубева В.А. и др. Изменение механической интеграции клеток переходного эпителия и иммунного статуса больных с опухолями мочевого пузыря // Урология. – 1994. – № 3. – С. 27–30.
13. Голенков А.А., Митина Т.А., Новиков В.В. и др. Клиническое значение растворимых молекул адгезии (SCD50-ICAM-3), апоптоза (SCD95) и SHLA класса I при лимфолифферативных заболеваниях // Российский биотерапевтический журнал. – 2002. – Т. 1, № 1. – С. 60–4.
14. Григорьева И.Н., Бурова О.С., Степанова Е.В. и др. Способность клеточных линий метастатической меланомы кожи к васкулогенной мимикрии // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 97–102.
15. Григорьева И.Н., Степанова Е.В., Барышников А.Ю. Клиническое значение васкулогенной мимикрии для больных меланомой кожи // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 25–30.
16. Григорьева И.Н., Харатешвили Т.К., Барышников А.Ю. Васкулогенная мимикрия: альтернативный механизм кровоснабжения опухоли? // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 1. – С. 20.
17. 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. – Т. 13, № 1. – С. 37–42.
18. 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. – Т. 13, № 1. – С. 49–54.
19. Гуревич Д.Г., И.Г. Меерович И.Г., Г.А. Меерович Г.А. и др. Влияние размеров липосом на уровень и селективность накопления тиосенса в опухоли // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 45–9.
20. Давиденко И.С., Пефти Е.Б., Фокин А.Н. Значение ангиогенеза в терапии метастатического рака молочной железы // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 4. – С. 49–54.
21. Давиденко И.С., Пефти Е.Б., Фокин А.Н. Роль бевацумаба (авастина) в терапии метастатического рака молочной железы нитрозомочевины // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 3. – С. 76–79.
22. Дедов И.И., Шестакова М.В., Кочемасова Т.В. и др. Дисфункция эндотелия в развитии сосудистых ослож-

- нений сахарного диабета (проблемная статья) // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. – 2001. – Т. 87. – С. 1073–84.
23. *Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Санарова Е.В., Бунатян Н.Д.* Наноструктурированные системы доставки противоопухолевых препаратов // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 21–7.
 24. *Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Орлова О.Л. и др.* Липосомальная лекарственная форма борхлорина // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 37–42.
 25. *Зангиева М.Т., Матюшин А.А., Соколова Д.В. и др.* Разработка и исследование иммунолипосомальных конструкций *in vitro* // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 19–28.
 26. *Казеев С.Г., Барышникова М.А., Полозкова А.П., Оборотова Н.А.* Разработка наноструктурированной лекарственной формы аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11. – №2. – С. 24а.
 27. *Козеев С.Г., Барышникова М.А., Афанасьева Д. и др.* Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, №2. – С. 24.
 28. *Карпенко Т.А., Бураковский А.И., Ястребова А.А., Тишкевич М.Н.* Иммуноферментный анализ эпидермального фактора роста // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 93.
 29. *Коломийцева А.А., Степанова Е.В., Гагарин И.М. и др.* Влияние молекулярно-биологических маркеров на эффективность ингибиторов рецептора эпидермального фактора роста у больных распространенным немелкоклеточным раком легкого // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 9–12.
 30. *Костылева О.И., Масляев А.В., Крюк Ю.В. и др.* Рак молочной железы и инсулиноподобные факторы роста // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 79–84.
 31. *Котова Е.А., Смирнова З.С., Краснюк И.И. и др.* Противоопухолевое действие липосомальной формы цифелина на лейкоз Р-388 // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 46.
 32. *Кочемасова Т.В., Шестакова М.В., Миленская Т.М. и др.* Изучение молекул адгезии эндотелиальных клеток и лейкоцитов у больных с диабетической микроангиопатией. // Молекулярная медицина. – 2004. – № 2. – С. 28–31.
 33. *Кочемасова Т.В., Шестакова М.В., Горельщикова В.А. и др.* Е-селектин(CD62) у больных с диабетической микроангиопатией-показатель активации эндотелия? // Российский биотерапевтический журнал. – 2002. – Т. 1, № 4. – С. 9–13.
 34. *Кочемасова Т.В., Шестакова М.В., Миленская Т.М. и др.* Межклеточные молекулы адгезии ICAM-1 (CD54) и ICAM-3 (CD50) у пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией // Российский биотерапевтический журнал. – 2002. – Т. 1, №3. – С. 22–6.
 35. *Кочемасова Т.В., Шестакова М.В., Миленская Т.М. и др.* Участие Е-селектина в развитии микрососудистых осложнений сахарного диабета I типа // Сахарный диабет. – 2002. – № 1. – С. 50–3.
 36. *Кочемасова Т.В., Шестакова М.В., Миленская Т.М. и др.* Роль межклеточной молекулы адгезии-1 в развитии диабетической ретинопатии // Сахарный диабет. – 2001. – № 4. – С. 14–9.
 37. *Кузнецова С.А., Косицкая Л.С., Соколов Д.И. и др.* Использование иммуноферментного анализа для оценки экспрессии адгезионных молекул на эндотелиальных клетках // Медицинская иммунология. – 1999. – Т. 1, № 5. – С. 71–4.
 38. *Лазарев А.Ф., Климачев В.В., Зорькин В.Г. и др.* Особенности маркеров Ki-67, PCNA, p53 и активности неоангиогенеза в прогнозе рака желудка // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 117–22.
 39. *Лацурис Л.А., Пинигина Н.М., Барышников А.Ю., Степанова Е.В.* Антиангиогенные свойства препарата Абисилин *in vivo* и *in vitro* // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 13–6.
 40. *Ланцова А.В., Сапрыкина Н.С., Оборотова Н.А., Барышников А.Ю.* Противоопухолевая активность наноструктурированной формы лизомустина на мышах с солидной опухолью меланомы В-16 // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 52.
 41. *Ланцова А.В., Сапрыкина Н.С., Санарова Е.В., Оборотова Н.А.* Изучение противоопухолевой активности наноструктурированной липосомальной формы лизомустина *in vivo* // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 32.
 42. *Матюшин А.А., Барышникова М.А., Барышников А.Ю., Караулов А.В.* Липосомы: организм, опухоль, клетка // Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. – 2013. – Т. 17, № 6. – С. 3–10.
 43. *Меерович И.Г., Оборотова Н.А.* Применение липосом в фотохимиотерапии. 2. Липосомальные формы для создания фотоактивируемых липосомальных препаратов и фотобиологических исследований. // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 6–12.
 44. *Меерович И.Г., Оборотова Н.А.* Применение липосом в фотохимиотерапии: 1. Липосомы в ФДТ // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 3–8.
 45. *Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Клименко О.В. и др.* Разработка липосомальной формы противоопухолевой вакцины // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 62–6.
 46. *Новиков В.В., Евсегнеева И.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю.* Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы при социально значимых инфекциях // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 100–5.
 47. *Новиков В.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. и др.* Особенности структурного состояния пула растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы // Молекулярная медицина. – 2009. – № 4. – С. 27–33.
 48. *Оборотова Н.А.* Направленная доставка противоопухолевых препаратов // Антибиотики и химиотерапия. – 1991. – Т. 36, № 10. – С. 47.
 49. *Оборотова Н.А.* Липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – Т. 35, № 5. – С. 30.
 50. *Оборотова Н.А.* Основные проблемы создания лекарственных форм противоопухолевых препаратов для внутривенного введения // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 2. – С. 27–31.
 51. *Оборотова Н.А., Барышников А.Ю.* Липосомальные лекарственные формы в клинической онкологии // Успехи современной биологии. – 2009. – Т. 121, № 5. – С. 464.

52. *Оборотова Н.А., Санарова Е.В.* Роль новых фармацевтических технологий в повышении избирательности действия противоопухолевых препаратов // *Российский химический журнал.* – 2012, № 3–4. – С. 33–40.
53. *Семенов Н.Н., Степанова Е.В., Личиницер М.Р.* Значение экспрессии интегринов А, паратиреоидного гормона, рецепторов к ПТПГ и остеопонтину в развитии метастазов в кости при раке молочной железы и почки // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 37–41.
54. *Смирнова З.С., Кубасова И.Ю., Макарова О.А. и др.* Доклиническое изучение липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 40–5.
55. *Смирнова З.С., Миерович И.Г., Лукьянец Е.А. и др.* Фенилтиозамещенные фталоцианины – новые фотосенсибилизаторы ближнего инфрокрасного диапазона // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 54–60.
56. *Смирнова З.С., Оборотова Н.А., Макарова О.А. и др.* Эффективность и фармакокинетика липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора «Фотосенс» на основе сульфатфалоцианина // *Химико-фармацевтический журнал.* – 2005. – Т. 39, № 7. – С. 3–7.
57. *Соколов Д.Е., Кузнецов С.А., Котов А.Ю. и др.* Цитокиновая регуляция экспрессии адгезионных молекул ICAM-1 и продукции хемокина IL-8 эндотелиальными клетками // *Медицинская иммунология.* – 2000. – Т. 2, № 1. – С. 25–33.
58. *Соломко Э.Ш., Степанова Е.В., Личиницер М.Р., Барышников А.Ю.* Оценка антиангиогенной активности in vitro: опыт Российского онкологического научного центра им. Н.Н.Блохина РАМН // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2007. – Т. 6, № 3. – С. 3–7.
59. *Соломко Э.Ш., Степанова Е.В., Абрамов М.Е. и др.* Ингибиторы ангиогенеза растительного происхождения: перспективы использования клинической онкологии // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 3–10.
60. *Старикова Э.А., Амчиславский Е.И., Соколов Д.И. и др.* Изменение поверхностного фенотипа эндотелиальных клеток под влиянием противовоспалительных и противовоспалительных цитокинов // *Медицинская иммунология.* – 2003. – Т. 5, № 1–2. – С. 39–48.
61. *Степанова Е.В., Барышников А.Ю., Личиницер М.Р.* Оценка ангиогенеза опухолей человека // *Успехи современной биологии.* – 2007. – Т. 120, № 6. – С. 599–604.
62. *Степанова Е.В., Файнштейн И.А.* Экспрессия молекулярно-биологических маркеров при аденокарциномах поджелудочной железы // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2013. – Т. 12, № 3. – С. 91–4.
63. *Тазина Е.В., Оборотова Н.А.* Селективная доставка препаратов в опухоль с помощью термочувствительных липосом и локальной гипертермии // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2008. – Т. 7, № 3. – С. 4–12.
64. *Толчева Е.Н., Оборотова Н.А.* Липосомы как транспортное средство для доставки биологически активных молекул // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 54–61.
65. *Хромова Н.В., Копнин П.Б., Степанов Е.В., Копнин Б.П.* Влияние подавления синтеза VEGF-С в клетках рака легкого и ободочной кишки человека на их рост, миграционную ангиогенную активность // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2009. – Т. 8, № 3. – С. 21–6.
66. *Чан Тху Хай Иен, Поздеев В.И., Меерович Г.А. и др.* Липосомальная лекарственная форма фотодитазина // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2010. – Т. 9, № 2. – С. 105–7.
67. *Ярмоненко С.П.* Новая парадигма комбинированной антиангиогенно-цитотоксической терапии рака // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2005. – Т. 4, № 4. – С. 50–8.
68. *Adams R.H., Alitalo K.* Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2007. – 8. – P. 464–78
69. *Anderson K.M., Guinan P., Rubenstein M.* Normoxic or hypoxic CD44/CD41 a(2) B(1) integrin-positive prostate PC3 cell side fractions and cancer stem cells // *Med Oncol.* – 2014. – 31. – P. 779.
70. *Beenken A., Mohammadi M.* The FGF family: biology, pathophysiology and therapy // *Nat Rev Drug Discov.* – 2009. – 8. – P. 235–53.
71. *Bell-McGuinn K.M., Matthews C.M., Ho S.N. et al.* A phase II, single-arm study of the anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibody volociximab as monotherapy in patients with platinum-resistant advanced epithelial ovarian or primary peritoneal cancer // *Gynecol Oncol.* – 2011. – 121. – P. 27.
72. *Birbrair A., Zhang T., Wang Z.M. et al.* Type-2 pericytes participate in normal and tumoral angiogenesis // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2014. – 307(1). – P. 25–38.
73. *Bluff J.E., Brown N.J., Reed M.W.R., Staton C.F.* Tissue factor, fngiogenesis and tumor progion // *Breast Cancer.* – 2008. – 10. – P. 204.
74. *Cao Y., Cao R., Hedlund E.M.* Regulation of tumor angiogenesis and metastasis by FGF and PDGF signaling pathways // *J Mol Med (Berl).* – 2008. – 86. – P. 785–9.
75. *Crawford Y., Kasman I., Yu L. et al.* PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment // *Cancer Cell.* – 2009. – 15. – P. 21–34.
76. *Czabanka M., Vinci M., Heppner F. et al.* Effects of Сунитиниб on tumor hemodynamics and delivery of chemotherapy // *International Journal of Cancer.* – 2009. – 124(6). – P. 1293–300.
77. *Deng J., Liu X., Rong L. et al.* IFN γ -responsiveness of endothelial cells leads to efficient angiostasis in tumours involving down-regulation of Dll4 // *J Pathol.* – 2014. – 233(2). – P. 170–82.
78. *Derkacheva V.M., Meerovich G.A., Meerovich I.G. et al.* Heteroooluminium tetra-3-phenyl thiophthalocianin is a new effective photosensitizer for phodinamic therapy and fluorescent diagnosis // *Bulleten Experimental Biology and Medicine.* – 2005. – 139(4). – P. 422–30.
79. *Diez H., Fischer A., Winkler F. et al.* Hypoxia-mediated activation of Dll4-Notch-Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate // *Experimental Cell Research.* – 2007. – 313(1). – P. 1–9.
80. *Di Lorenzo G., Carteni G., Autorino R. et al.* Phase II study of Сорафениб in patients with Сунитиниб-refractory metastatic renal cell cancer // *Journal of Clinical Oncology.* – 2009. – 27. – P. 4469–74.
81. *Du J., Sun B., Zhao X. et al.* Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation by inducing epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinoma // *Gynecol. Oncol.* – 2014. – 133(3). – P. 575–83.

82. Hale J.S., Li M., Sinyuk M. et al. Context dependent role of the CD36–thrombospondin–histidine-rich glycoprotein axis in tumor angiogenesis and growth // *PloS One*. – 2012. – 7. – e40033.
83. Hynes R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines // *Cell*. – 2002. – 110. – P. 673–87.
84. Febbraio M., Hajjar D.P., Silverstein R.L. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism // *J Clin Invest*. – 2001. – 108. – P. 785–91.
85. Feng G., Lei Z., Wang D. et al. The evaluation of anti-angiogenic effects of endostar on rabbit VX2 portal vein tumor thrombus using perfusion MSCT // *Cancer Imaging*. – 2014. – 14. – P. 17–24.
86. Fischer C., Mazzone M., Jonckx B. et al. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? // *Nat Rev Cancer*. – 2008. – 8. – P. 942–56.
87. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications // *N Engl J Med*. – 1971. – 285. – P. 1182–6.
88. Fujii T., Yajima R., Hirakata T. et al. Impact of the prognostic value of vascular invasion, but not lymphatic invasion, of the primary tumor in patients with breast cancer // *Anticancer Res*. – 2014. – 34(3). – P. 1255–9.
89. Fujii T., Sutoh T., Morita H. et al. Vascular invasion, but not lymphatic invasion, of the primary tumor is a strong prognostic factor in patients with colorectal cancer // *Anticancer Res*. – 2014. – 34(3). – P. 47–51.
90. Fukumoto S., Morifuji M., Katakura Y. et al. Endostatin inhibits lymph node metastasis by a down-regulation of the vascular endothelial growth factor C expression in tumor cells // *Clin Exp Metastasis*. – 2005. – 22. – P. 31–8.
91. Geiger T.R., Peeper D.S. Metastasis mechanisms // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2009. – 1796(2). – P. 293–308.
92. Ghali W., Vaudry D., Jouene T., Marzduki M.N. Extracts from medical plants inhibit cancer cell proliferation, induce apoptosis in ovary, lung and neural cancer cell lines // *Cancer & Metabolism*. – 2014. – 2. – P. 21.
93. Guldur ME, Kocarlan S, Ozardali HI, et al. The relationship of mast cells and angiogenesis with prognosis in renal cell carcinoma // *J Pak Med Assoc*. – 2014. – 64(3). – P. 300–3.
94. Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W. et al. Бевацизумаб plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer // *N Engl J Med*. – 2004. – 350. – P. 2335–42.
95. Hu B., Cheng S.Y. Angiopoietin-2: development of inhibitors for cancer therapy // *Curr Oncol Rep*. – 2009. – 11. – P. 111–6.
96. Jain R.K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy // *Science*. – 2005. – 307. – 5706. – P. 58–62.
97. Joyce J.A., Pollard J.W. Microenvironmental regulation of metastasis // *Nature Reviews Cancer*. – 2009. – 9(4). – P. 239–52.
98. Kumagai Y., Sobajima J., Higashi M. et al. Angiogenesis in superficial esophageal squamous cell carcinoma: assessment of microvessel density based on immunostaining for CD34 and CD105 // *Jpn J Clin Oncol*. – 2014. – 44(6). – P. 526–33.
99. Kajiya R., Hirakawa S., Ma B. et al. Hepatocyte growth factor promotes lymphatic vessel formation and function // *EMBO Journal*. – 2005. – 24(16). – P. 2885–95.
100. Kuhnert F., Kirshner J.R., Thurston G. Dll4-Notch signaling as a therapeutic target in tumor angiogenesis // *Vasc Cell*. – 2011. – 3. – P. 20.
101. Lawler J., Detmar M. Tumor progression: the effects of thrombospondin-1 and -2 // *Int J Biochem Cell B*. – 2004. – 36. – P. 1038–45.
102. Lesyk Y.M., Radziwon-Balicka G., Jurasz A. Pharmacological regulation of platelet factors that influence tumor angiogenesis // *Semin Oncol*. – 2014. – 41(3). – P. 370–7.
103. Levacheva I., Samsonova O., Tazina E. et al. Optimized thermosensitive liposomes for selective doxorubicin delivery: Formulation development, quality analysis and bioactivity // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2014. – 121. – P. 248–56.
104. Leighl N.B., Raez L.E., Besse B. et al. A multicenter, phase 2 study of vascular endothelial growth factor trap (Aflibercept) in platinum- and erlotinib-resistant adenocarcinoma of the lung // *J Thorac Oncol*. – 2010. – 5. – P. 1054–9.
105. Ma W.W., Adjei A.A. Novel agents on the horizon for cancer therapy // *Cancer Journal for Clinicians*. – 2009. – 59(2). – P. 111–37.
106. Ma W.W., Waxman D.J. Combination of antiangiogenesis with chemotherapy for more effective cancer treatment // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2008. – 7(12). – P. 3670–84.
107. Maity G., Mehta S., Haque I. et al. Pancreatic tumor cell secreted CCN1/Cyr61 promotes endothelial cell migration and aberrant neovascularization // *Sci Rep*. – 2014. – 4. – P. 4995.
108. Marigo I., Dolcetti L., Serafini P. et al. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells // *Immunological Reviews*. – 2008. – 222(1). – P. 162–79.
109. Merkulova T.I., Kropachev N.K.Y., Timofeeva O.A. et al. Species specific hepatocarcinogen inhibition of the glucocorticoid induction of tyrosine aminotransferase gene in mouse and rat liver // *Biochemistry*. – 2003. – 68(5). – P. 520–8.
110. Mittal K., Ebos J., Rini B. Angiogenesis and the tumor microenvironment: vascular endothelial growth factor and beyond // *Semin Oncol*. – 2014. – 41(2). – P. 235–51.
111. Morikawa S., Baluk P., Kaidoh T. et al. Abnormalities in Pericytes on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors // *American Journal of Pathology*. – 2002. – 160(3). – P. 985–1000.
112. Oktem G., Bilir A., Uslu R. et al. Expression profiling of stem cell signaling alters with spheroid formation in CD133/CD44 prostate cancer stem cells // *Oncol Lett*. – 2014. – 7. – P. 2103–9.
113. O'Day S.J., Pavlick A.C., Albertini M.R. et al. Clinical and pharmacologic evaluation of two dose levels of intetumumab (CNT0 95) in patients with melanoma or angiosarcoma // *Invest New Drugs*. – 2011. – 30(3). – P. 1074–81.
114. Orimo A., Gupta P.B., Sgroi D.C. et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion // *Cell*. – 2005. – 121. – P. 335–48.
115. Osz K., Ross M., Patik J. The thrombospondin-1 receptor CD36 is an important mediator of ovarian angiogenesis and folliculogenesis // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2014. – 12. – P. 21–8.

116. *Rege T.A., Stewart J.Jr., Dranka B. et al.* Thrombospondin-1-induced apoptosis of brain microvascular endothelial cells can be mediated by TNF-R1 // *J Cell Physiol.* – 2009. – 218. – P. 94–103.
117. *Pennacchiotti S., Michieli P., Galluzzo M. et al.* Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene // *Cancer Cel.* – 2003. – 3(4). – P. 347–61.
118. *Petrik J.J., Gentry P.A., Feige J.J., LaMarre J.* Expression and localization of thrombospondin-1 and –2 and their cell-surface receptor, CD36, during rat follicular development and formation of the corpus luteum // *Biol Reprod.* – 2002. – 67. – P. 1522–31.
119. *Prager G.W., Breuss J.M., Steurer S. et al.* Vascular endothelial growth factor receptor-2-induced initial endothelial cell migration depends on the presence of the urokinase receptor // *Circ Res.* – 2004. – 94. – P. 1562–70.
120. *Prager G.W., Poetler M., Unseld M., Zielinski C.C.* Angiogenesis in cancer: Anti-VGF escape mechanisms // *Translation Lung Cancer Research.* – 2012. – 1. – P. 1–16.
121. *Rapisarda A., Melillo G.* Role of the hypoxic tumor microenvironment in the resistance to anti-angiogenic therapies // *Drug Resistance Updates.* – 2009. – 12(3). – P. 74–80.
122. *Reardon D.A., Neyns B., Weller M. et al.* Cilengitide: an RGD pentapeptide $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ integrin inhibitor in development for glioblastoma and other malignancies // *Future Oncol.* – 2011. – 7. – P. 339–54.
123. *Rini B.I., Halabi S., Rosenberg J.E. et al.* Бевацизумаб plus интерферон альфа compared with интерферон альфа monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: CALGB 90206 // *J Clin Oncol.* – 2008. – 26. – P. 5422–8.
124. *Shojaei F., Wu X., Qu X. et al.* G-CSF-initiated myeloid cell mobilization and angiogenesis mediate tumor refractoriness to anti-VEGF therapy in mouse models // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2009. – 106(16). – P. 6742–7.
125. *Senchukova M., Kiselevsky M.V.* The «cavitary» type of angiogenesis by gastric cancer. Morphological characteristics and prognostic value // *J. Cancer.* – 2014. – 5. – P. 311–9.
126. *Singh V., Singh S., Kapadia A.* Prognostic correlation of breast neoplasm with MAGS (Microscopic Angiogenesis Grading System) score // *INDIAN j. of Asic and Applid Medical Research.* – 2014. – 3(2). – P. 696–700.
127. *Smith M.A.* Lessons learned from adult clinical experience to inform evaluations of VEGF pathway inhibitors in children with cancer // *Pediatr Blood Cancer.* – 2014. – 61(8). – P. 1497–505.
128. *Stiffler S., Dordenic G.* Prostate cancer and new insights in angiogenesis // *Journal frontiers Oncol.* – 2014. – 4. – P. 243.
129. *Sun B., Zhang S., Ni C. et al.* Correlation between melanoma angiogenesis and the mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells derived from bone marrow // *Stem Cells Dev.* – 2005. – 14(3). – P. 292–8.
130. *Taskiran C., Erdem O., Onan A. et al.* Maspin expression in endometrial hyperplasia and carcinoma, and its relation with angiogenesis // *Eur J Gynaecol Oncol.* – 2014. – 35(2). – P. 134–9.
131. *Thurston G., Noguera-Troise I., Yancopoulos G.D.* The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth // *Nature Reviews Cancer.* – 2007. – 7(5). – P. 327–31.
132. *Vartanian A.A., Stepanova E.V., Gutorov S.V. et al.* Prognostic significance of periodic acid-schiff-positive patterns in clear cell renal carcinoma // *The Canadian Journal of Urology.* – 2009. – 16(4). – P. 4726–32.
133. *Vartanian A.A., Stepanova E.V., Grigorieva I. et al.* VEGFR1 and PKCa signaling control melanoma vasculogenic mimicry in a VGFR2 kinasindependent manner // *Melanoma Resorch* – 2011. – 21(2). – P. 91–8.
134. *Vartanian A.A., Burova O.S., Stepanova E.V. et al.* The involvement of apoptosis in melanoma vasculogenic mimicry // *Melanoma Research.* – 2007. – 11(1). – P. 1–8.
135. *Wang W., Lin P., Han C. et al.* Vasculogenic mimicry contributes to lymph node metastasis of laryngeal squamous cell carcinoma // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2010. – 29. – P. 60.
136. *Weller M.* Novel diagnostic and therapeutic approaches to malignant glioma // *Swiss Med Wkly.* – 2011. – 141. – P. 13210.
137. *Zheng Y., Li S., Ding Y. et al.* The role of miR-18a in gastric cancer angiogenesis // *Hepatogastroenterology.* – 2013. – 60(127). – P. 1809–13.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

FGFs – факторы роста фибробластов

PDGF – тромбоцитарный фактор роста

TNF- α – опухоли-некротический фактор

PDGF – фактор роста тромбоцитов

VEGF – Фактор роста эндотелия сосудов

К 60-летию Жумагазина Жанабая Дербесеновича



Жумагазин Жанабай Дербесенович – доктор медицинских наук Республики Казахстан, Российской Федерации, профессор, врач высшей категории по специальностям «урология», «онкология», «организация здравоохранения», независимый эксперт по специальности «урология», член Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням, имеет сертификат по специальности «инфекционные болезни».

Родился 01.01.1955 г. в поселке Зеленый Дол Хобдинского района Актюбинской области.

С 1962 г. по 1972 г. учился в общеобразовательной средней школе имени «15 лет Казахской ССР» и закончил ее с отличием. В 1973 году он находился в рядах Советской армии, где прошел шестимесячную военную подготовку в Бердичевской танковой дивизии. За отличные знания воинской службы было досрочно присвоено военное звание сержант, а в запасе – старшина.

В 1975 году поступил в Актюбинский государственный медицинский институт на факультет «Лечебное дело» и успешно его окончил в 1982. В 1978 году за активное участие в общественной работе института он награжден правительственной наградой «Грамота Верховного Совета Казахской ССР».

С 1982 г. по 1989 г. работал хирургом, урологом в лечебных учреждениях города Актюбинска, где рекомендовал себя грамотным специалистом.

С 1989 г. по 1991 г. он учился в клинической ординатуре во Всесоюзном Онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина Академии Медицинских Наук СССР, г. Москва.

За время обучения в клинической ординатуре он успешно подготовил и защитил кандидатскую дис-

сертацию на тему «Возможности лечения рака предстательной железы с метастазами в кости». В 1992 году ему в ВОНЦ им. Н.Н. Блохина АМН СССР была присуждена ученая степень кандидата медицинских наук.

С 1992 г. по 1993 г. он заведовал хирургическим отделением Актюбинского межобластного научно-практического онкологического объединения.

С 1993 г. по 1996 г. обучался в докторантуре Онкологического Научного Центра им. Н.Н. Блохина Академии Медицинских Наук России, г. Москва, где успешно защитил докторскую диссертацию на тему «Иммунотерапия и гормонотерапия рака предстательной железы». В 1996 году ему была присвоена ученая степень доктора медицинских наук.

В 2004 году ВАК Республики Казахстан присвоил ученое звание «профессор».

С 1996г. по 2001г. заведовал кафедрой урологии, был деканом лечебного факультета Западно-Казахстанского Государственного медицинского университета им. Марата Оспанова.

За время трудовой деятельности в Западно-Казахстанском Государственном медицинском университете он стал автором более десяти учебных пособий и более двадцати научных статей по урологии, подготовил трех кандидатов медицинских наук, получил патент за изобретение «Метод криодеструкции опухоли предстательной железы».

С 2001 по 2004 гг. возглавил им созданное отделение онкоурологии Казахского НИИОР. За время работы в НИИ он внедрил пластические операции при раке мочевого пузыря, расширенные операции и органосохраняющие операции при раке почки. Впервые в Казахстане применил методы иммунотерапии при раке почки и мочевого пузыря, а также методы химической кастрации антиандрогенами в лечении рака предстательной железы. Научные публикации проведенных исследований были освещены в отечественных и зарубежных журналах. В 2004 году опубликовал монографию «Диагностика и лечение рака предстательной железы», являющейся руководством для практических врачей, студентов и преподавателей.

С 2004 по 2007 гг. работал профессором кафедры урологии Алматинского государственного института усовершенствования врачей (АГИУВ), одновременно деканом хирургического факультета. В 2004 году он открыл новый курс «Нейроурология», где совместно с врачами, профессорско-преподавательским составом кафедры урологии обсуждались и представлялись новые научные достижения по специальности. Он внедрил ряд нейрохирургических операций в области урологии. За проведение хирургической помощи пациентам с нейрогенным мочевым пузырем методом «Аутоотрасплатация мочевого пузыря сегментом желудка» он получил соответствующий патент на изобретение.

В 2007 г. Управлением здравоохранения наш юбиляр был приглашен для оказания практической помощи пациентам в г. Атырау, где с 2007 г. по 2008 г. работал заведующим отделением урологии областной больницы, одновременно являлся главным внештатным урологом области. Здесь им были внедрены ряд пластических операций на уретре у мужчин и женщин, разные современные операции при опухоли мочевого пузыря и почки. В связи с особенностями экологии данного региона им было изучено влияние экологии на мужскую репродуктивность, а также развитие мочекаменной болезни у местного населения. Научные исследования о влиянии нефтепродуктов и загрязненной природы на жителей региона были опубликованы в различных научных журналах Казахстана и России.

В 2008 г. он был приглашен для оказания практической помощи в онкологический диспансер г. Астаны, где работал профессором кафедры онкологии до дипломного образования, затем заведующим курсом онкологии кафедры хирургических болезней № 2 последипломного образования АО «Медицинский Университет Астана». За этот период работы им были проведены международные мастер-классы, опубликованы статьи по разным тематикам в онкологии и организации здравоохранения.

В октябре 2011 г. был назначен главным врачом городской инфекционной больницы г. Астаны.

Наряду с управленческой и практической деятельностью он продолжает научную деятельность в инфекционной больнице, является разработчиком и автором ряда научных статей о влиянии инфекции на развитие онкологических заболеваний, которые были опубликованы в ведущих медицинских журналах Республики Казахстан.

Награжден грамотами градоначальника г. Астаны за успешный менеджмент в 2012 – 2013 гг. Государственное казенное коммунальное предприятие «Городская инфекционная больница» г. Астаны в 2014г. по результатам Национального бизнес-рейтинга по программе «Общегосударственная Республиканская Рейтинговая программа награждения предприятий-лидеров экономики Казахстана» определена как «Лидер Отрасли 2014», на основании данных национального статистического ранжирования заняла 2-е место в Республике Казахстан, 1-е место в г. Астана. Коллектив больницы под его руководством получил сертификат «Лидер отрасли 2014», Золотой знак «Лидера отрасли 2014», а он, как руководитель, награжден орденом «Звезда Славы. Экономика Казахстана» (единственный выпуск в Республике Казахстан) как свидетельство признания личного вклада в развитие экономики страны.

Коллективы городской инфекционной больницы, онкологического диспансера, кафедры онкологии, инфекционных болезней, хирургических болезней №2 медицинского университета Астаны, кафедры урологии АГИУВ и Западно-Казахстанского Государственного медицинского университета им. Марата Оспанова сердечно поздравляют Ж.Д. Жумагазина с 60-летием, желают крепкого здоровья, дальнейших творческих успехов в работе врача, ученого, педагога, новатора, руководителя, а в семейной жизни – замечательного папы и дедушки!

Рисунки к статье И.С. Брюховецкого и соавт.
**МИГРАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА
К КЛЕТКАМ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЛИНИИ U87 *IN VITRO***

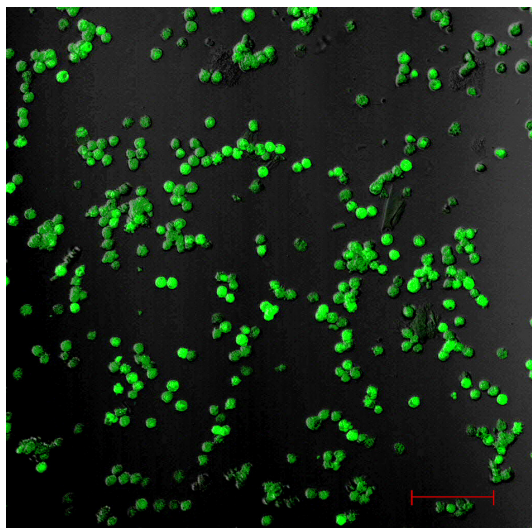


Рис. 2. Клетки глиобластомы человека линии U87 в культуре. Окраска Vybrant® CFDA SE Cell Tracer. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, флуоресценция при воздействии лазера с λ 488 нм, ув. об.: $\times 10$.

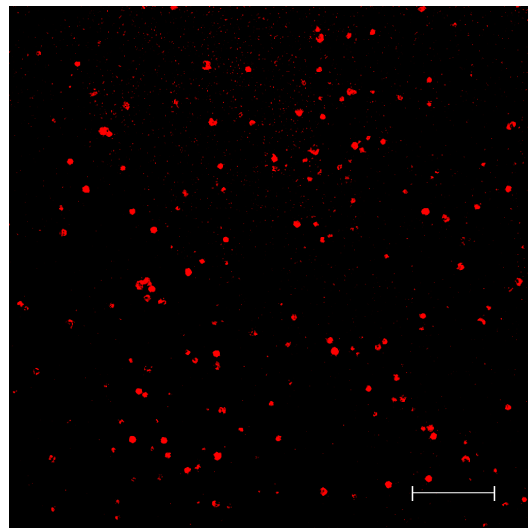


Рис. 3. Гемопоэтические CD 34⁺ стволовые клетки в культуре. Окраска CellTracker™ Red CMTPX. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, флуоресценция при воздействии лазера с λ 546 нм, ув. об.: $\times 10$.

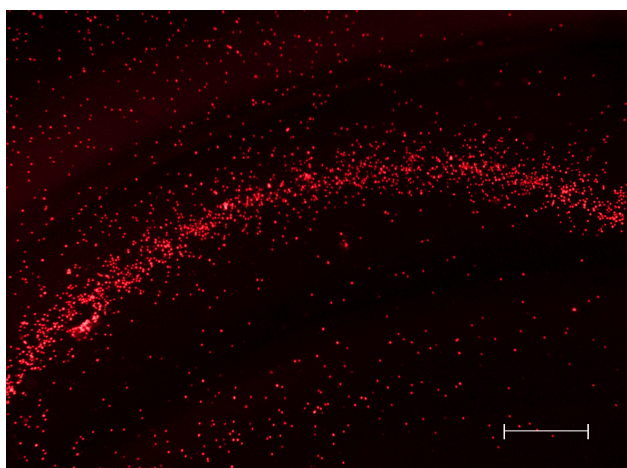


Рис. 4. Формирование гемопоэтическими стволовыми клетками вала по периметру культуральной вставки содержащей клетки глиобластомы. Окраска CellTracker™ Red CMTPX. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, флуоресценция при воздействии лазера с λ 546 нм, ув. об.: $\times 10$.

Рисунки к статье И.С. Брюховецкого и соавт.
**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO* ПОСЛЕ КУРСА ХИМИОТЕРАПИИ
НА МОДЕЛИ ГЛИОБЛАСТОМЫ У КРЫС**

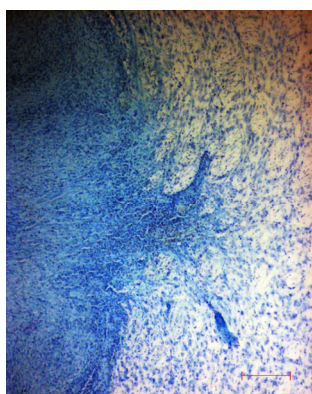


Рис. 2. Участок инвазивного роста глиомы C6. Окраска толудиновым синим $\times 20$. Видна размытость границ опухоли, участок инвазии и инфильтрация неопластическими элементами мозгового вещества.

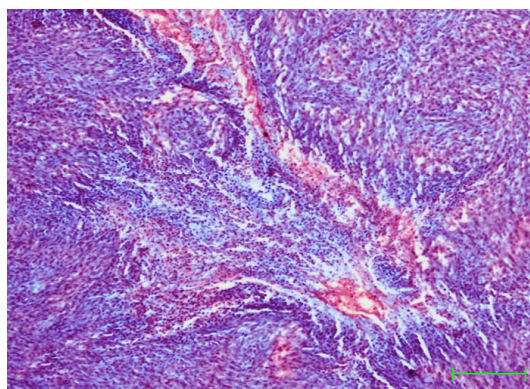


Рис. 3. Зона центрального некроза глиомы C6. Окраска по методу И.В. Викторова. Ацидофильные клетки избирательно окрашиваются в гранатовый цвет $\times 10$.

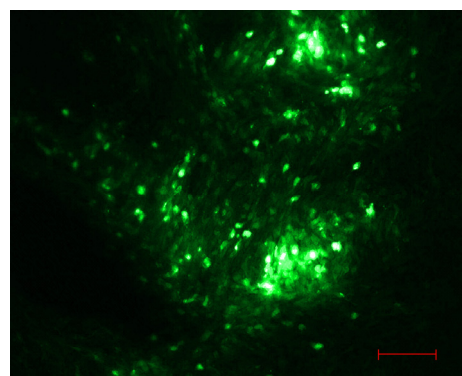


Рис. 4. Узел глиомы C6 в головном мозге крысы. Клетки окрашены Vybrant® CFDA SE Cell Tracer. Система LSM T-PMT Carl Zeiss Aim-system, лазер (λ 488 nm) $\times 20$.

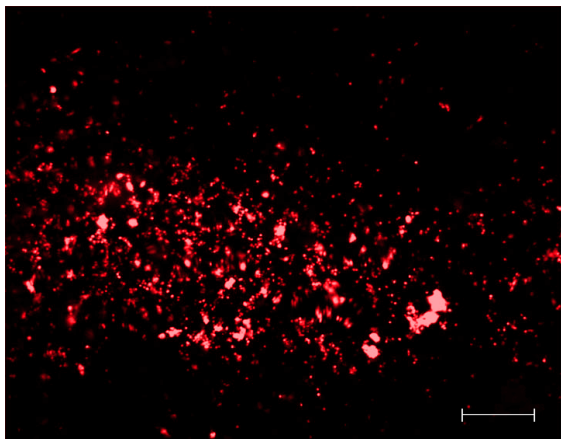


Рис. 7. Миграция трансплантированных клеток из зоны введения в направлении неопластического узла. Окраска флуоресцентным трейсером Red CMTPX, Система визуализации Carl Zeiss LSM 710, лазер (λ 650 nm) \times 20.

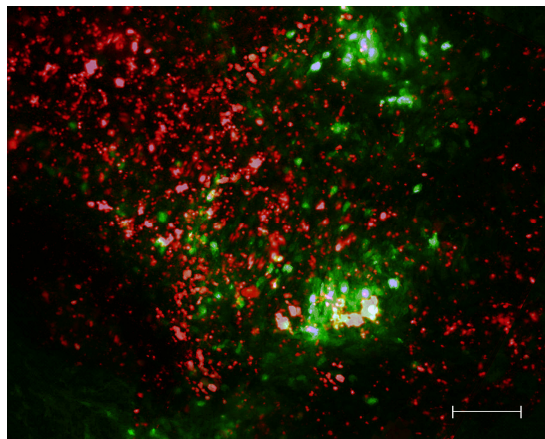


Рис. 8. Red CMTPX – позитивные элементы клеточного препарата (лазерная флуоресценция λ 650 nm, красный) в паренхиме опухоли и тканях прилежащих к опухолевому узлу образованному CFDA SE- позитивными клетками глиомы С6 (лазерная флуоресценция λ 488 nm, зеленый) \times 20.

Рисунки к статье *С.С. Брусова и соавт.*

**НОВЫЙ КАТИОННЫЙ ПУРПУРИНИМИД
ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ БИОПЛЕНОК *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

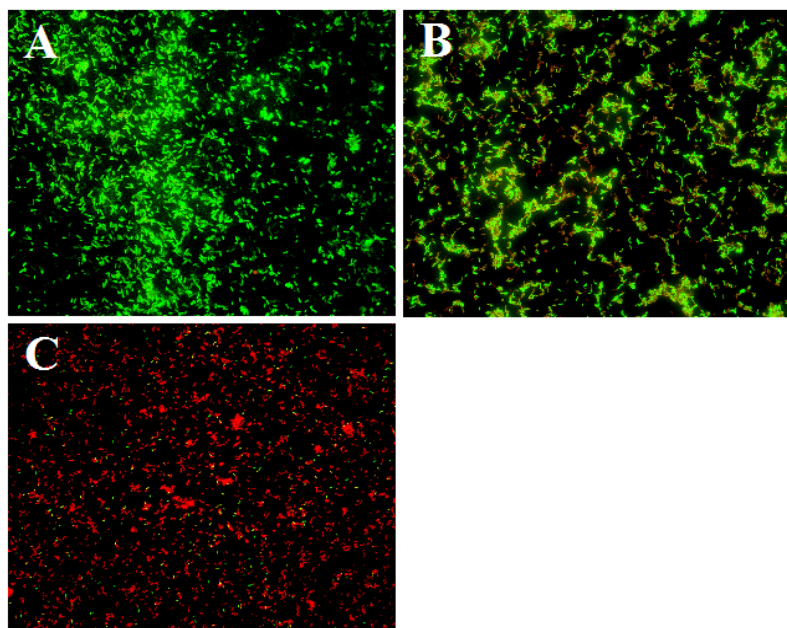


Рис. 4. Флуоресцентные микрофотографии биопленок бактерий *Ps. aeruginosa* 32:

А – интактный контроль;

В – после инкубации с фотосенсибилизатором (концентрация 0,5 мМ) без облучения;

С – после инкубации с фотосенсибилизатором (концентрация 0,5 мМ) с облучением дозой 36 Дж/см². Увеличение 600 \times .