



ISSN 1726-9784

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции
"ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ"

Нижний Новгород, 18-19 мая 2010г.

**Russian Journal
of Biotherapy**

2/2010

ISSN 1726-9784

РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№2 Том 9 2010 г.

УДК 616-085.2/.3

Учредители

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), Н.А. Батурина,
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.М. Моисеенко, д-р мед. наук, проф. (Санкт-Петербург), В.В. Новиков, д-р биол. наук, проф. (Нижний Новгород),
Н.С. Сергеева, д-р мед. наук, проф. (Москва), Е.В. Степанова, д-р мед. наук (Москва),
Н.Н. Тупицын, д-р мед. наук, проф. (Москва), Е.Г. Турнянская, канд. мед. наук (Москва),
С.А. Тюляндин, д-р мед. наук, проф. (Москва), Ю.В. Шишкин, д-р мед. наук, проф. (Москва),
И.Ж. Шубина, канд. биол. наук (Москва), Р.И. Якубовская, д-р мед. наук, проф. (Москва)

Редакционный совет

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

«Российский биотерапевтический журнал» является рецензируемым изданием

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

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

Почтовый адрес:

115478 Москва, Каширское ш., 24
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН
НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей
Тел.: +7 (495) 323 57 00, +7 (495) 324 10 65; факс: +7 (495) 324 22 74;
E-mail: biotherapy_rbj@mail.ru
Интернет-версия: www.ronc.ru/1915

Подписной индекс 81679

Объем 6,5 усл.-печ. листов,
подписано в печать 19.03.2010
Тираж 1000 экз.

Издательская группа РОНЦ:

115478 Москва, Каширское шоссе, д. 24.
Тел. +7 (495) 324 24 70; ronc@list.ru
Координаторы: Е.Г. Турнянская, Б.Б. Крюков (макет)

Принт-менеджмент:

Типография «Огни Москвы»
Тел.: +7 (494) 933-87-78
info@ognimsk.ru, www.ognimsk.ru

Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции
“ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ”

Нижний Новгород, 18-19 мая 2010г.

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Т.В. Ахлынина, Н.И. Гринева, Л.П. Герасимова, Т.Е. Манакова, Д.А. Шмаров, Т.Г. Сарычева, А.М. Тимофеев, Н.М. Найденова, Т.В. Боровкова, Г.П. Саркисян, А.Р. Гавричкова, Л.Ю. Колосова, Т.И. Колошейнова, Л.Г. Ковалева, А.В. Воронцова, А.Г. Туркина
**РАЗЛИЧИЯ В ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ Rh⁺КЛЕТОК
ОТ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ БОЛЬНЫХ ХМЛ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ.
Rh⁺КЛЕТКИ С НИЗКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ПРОЛИФЕРАЦИИ
И СПОСОБНОСТЬЮ БЛОКИРОВАТЬ АПОПТОЗ.....**3

Л.М. Михайлова, *И.Б. Меркулова, Н.П. Ермакова, А.И. Мишин, Н.Ю. Кульбачевская, В.М. Бухман*
**МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ
К ИССЛЕДОВАНИЮ ТУМОРОГЕННОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ
И БИОПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ
ПРИ ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ БЕЗОПАСНОСТИ.....**13

Е.А. Сафонова, К.А. Лопатина, Т.Г. Разина, Е.П. Федорова, А.В. Пахомова, А.В. Вычужанина, Е.П. Зуева, Л.А. Ефимова
**КОРРЕКЦИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ПАКЛИТАКСЕЛА
НА СИСТЕМУ КРОВИ И ЭПИТЕЛИЙ ТОНКОЙ КИШКИ
ВОДОРАСТВОРИМЫМИ ПОЛИСАХАРИДАМИ МАТЬ-И-МАЧЕХИ ОБЫКНОВЕННОЙ,
АИРА БОЛОТНОГО И ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ.....**19

Б.А. Бакиров, А.В. Варшавский, А.Б. Бакиров
**ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЫ
НА ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ
В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН.....**25

Н.В. Андропова, Н.Т. Райхлин, Е.М. Трещалина, Н.В. Шалунова, А.Ю. Барышников
**РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ
ОНКОГЕННЫХ ПОТЕНЦИЙ МЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ
НА ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ МЫШАХ.....**29

Н.А.В. Киселев, Г.А. Гордина, И.Ю. Кубасова, С.А. Зорина, О.И. Тарасова
**РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОФОРМЛЕНИЮ ЗАЯВОК
НА РЕЗУЛЬТАТЫ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ.....**35

ТЕЗИСЫ

Клиническая онкология.....39
Экспериментальная онкология.....49
Экспериментальная химиотерапия.....63
Лекарственные формы.....87
ФДТ.....93

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*Чан Тхи Хай Иен¹, В.И. Поздеев², Г.А. Меерович³, С.Ш. Каршиева², Л.М. Борисова²,
О.Л. Орлова², А.П. Полозкова², Г.В. Раменская¹, Н.А. Оборотова²*
ЛИПОСОМАЛЬНАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА ФОТОДИТАЗИНА.....105

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 616-006.446.8-092.4:616-091.818:616.155.34:576.385.5

Т.В. Ахлынина, Н.И. Гринева, Л.П. Герасимова, Т.Е. Манакова, Д.А. Шмаров, Т.Г. Сарычева, А.М. Тимофеев, Н.М. Найденова, Т.В. Боровкова, Г.П. Саркисян, А.Р. Гавричкова, Л.Ю. Колосова, Т.И. Колошейнова, Л.Г. Ковалева, А.В. Воронцова, А.Г. Туркина

РАЗЛИЧИЯ В ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ Ph⁺КЛЕТОК ОТ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ БОЛЬНЫХ ХМЛ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ. Ph⁺КЛЕТКИ С НИЗКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ПРОЛИФЕРАЦИИ И СПОСОБНОСТЬЮ БЛОКИРОВАТЬ АПОПТОЗ

Гематологический научный центр РАМН, Москва

Контактная информация:

Гринева Нина Ивановна, д-р хим. наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории генной инженерии
адрес: 125167, Москва, Новозыковский проезд, 4а; тел.: +7(499)615-31-02; e-mail: nigrin27@mail.ru

Статья поступила: 19.06.2010, принята к печати 01.04.2010.

Резюме

Ранее выявлены 3 типа Ph⁺клеток от разных больных ХМЛ, которые отличаются эффективностью пролиферации и дифференцировки, скоростями накопления пролиферирующих и созревающих без деления клеток [7]. Здесь исследована пролиферация и дифференцировка Ph⁺клеток 2 типа. Она протекает с низкой эффективностью P/D ≤ 1 и скоростью созревания большей, чем скорость пролиферации. Доля Ph⁺клеток в фазах клеточного цикла S+G₂/M менее 20÷40%. Пролиферация и дифференцировка Ph⁺клеток 2 типа сопровождается блокированием апоптоза и значительным накоплением нейтрофилов, особенно сегментоядерных, существенным ингибированием пролиферации Ph⁺клеток созревающими нейтрофилами и пониженным содержанием миелоцитов. Блокирование апоптоза и накопление нейтрофилов происходят асинхронно накоплению миелоцитов, но синхронно ингибированию пролиферации. При этом происходит инверсия первоначального порядка (последовательности) накопления созревающих нейтрофилов (M>MM>ПЯ>СЯ в СЯ>ПЯ>MM>M), что ведет к накоплению всех нейтрофилов и постепенному изменению содержания каждого из них. Эти свойства Ph⁺клеток 2 типа определяют клеточную регуляцию пролиферации и дифференцировки Ph⁺клеток 2 типа с ингибированием пролиферации и поэтапным торможением созревания самих нейтрофилов, вероятно, по механизму обратной связи. Кривые роста популяции Ph⁺лейкоцитов 2 типа не отражают пролиферации Ph⁺клеток. Рост клеточности лейкоцитов связан с увеличением содержания созревающих нейтрофилов из-за блокирования их гибели, низкой эффективностью пролиферации, превышением скорости созревания над скоростью пролиферации. Ph⁺клетки 2 типа составляют треть от исследованных образцов Ph⁺клеток; все из них от больных ХМЛ в хронической фазе (ХФ).

Ключевые слова: культивирование гемопоэтических Ph⁺лейкоцитов (моноклеаров), Ph-хромосома, ХМЛ, кинетика пролиферации, дифференцировки, апоптоз Ph⁺клеток *in vitro*, распределение Ph⁺клеток по фазам клеточного цикла, пролиферации и Ph⁺клеток, регуляция клеточной пролиферации и дифференцировки созревающими нейтрофилами.

T.V. Akhynina, N.I. Grineva, L.P. Gerasimova, T.E. Manakova, D.A. Schmarov, T.G. Sarycheva, T.V. Borovkova, N.M. Naydenova, G.P. Sarkisyan, A.M. Tumofeev, L.Yu. Kolosova, T.I. Kolosheynova, L.G. Kovaleva, A.V. Voronzoza, A.G. Turkina

DIFFERENCES IN PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF Ph⁺CELLS FROM INDIVIDUAL CML PATIENTS IN THE SUSPENSION CULTURE. Ph⁺CELLS WITH LOW PROLIFERATING EFFICIENCY AND ABILITY OF APOPTOSIS ARREST
GU Research Center for Hematology of RAMS, Moscow

Abstract

Three types of Ph⁺cells from individual CML patients have been detected by studying kinetics peculiarities of their proliferation and differentiation in the culture [7]. Here we have studied the proliferation and differentiation of type 2 Ph⁺cells that reveal low proliferating P/D efficiency and higher rate for accumulation of neutrophils matured without dividing. P/D index is ratio between rates for P and D cells accumulations. Proliferation and differentiation of type 2 Ph⁺cells reveal P/D index 0,2–1, number of cycling cells into cycle phases S+G₂/M was below 20÷45%. The proliferation and differentiation of Ph⁺ type 2 cells is accompanied by apoptosis inhibition and significant accumulation of neutrophils, particularly high segment neutrophils, we have also observed the reduced proliferation of Ph⁺ cells and low content of myelocytes. Apoptosis blocking and matured neutrophils accumulation occur anisochrous myelocytes accumulation but synchronously proliferation inhibition. This results in neutrophils primary consistency inversion myelocytes (M) > metamyelocytes (MM) > band neutrophils (BN) > segment neutrophils (SN) into SN > BN > MM > M, which lead to accumulation of all types neutrophils. These peculiar properties of Ph⁺ type 2 cells determine the cells proliferation and differentiation in parallel with inhibition of neutrophils maturation. We suggest this take place by feed back mechanism. The curves of Ph⁺ type 2 leukocytes population accumulating do not reflect the proliferation rate of Ph⁺ type 2 leukocytes. The increased level of these cells we link with the increasing number of matured neutrophils and their non-efficient proliferation. Ph⁺ type 2 cells account for one-third fraction of investigated Ph⁺ cells. We have derived all of cells from patient with CML in a quite phase.

Key words: cultivation of hematopoietic Ph⁺leukocytes, chronic myeloid leukemia, kinetics of differentiation and apoptosis *in vitro*, Ph⁺cells in culture, cycling of Ph⁺cell distribution in cell phases, Ph⁺cell proliferate and differentiate efficiency, regulation of cell proliferation by matured cells.

Ранее с помощью кинетического подхода к исследованию ПД Ph^+ клеток при ХМЛ *ex vivo* обнаружено, что у разных больных ХМЛ встречаются три типа Ph^+ клеток, отличающихся характеристиками пролиферации и созревания. Различия обнаруживаются в относительных скоростях пролиферации и созревания, в индексах эффективности P/D, в отношении к апоптозу и продолжительности поддержания данных условий при ПД Ph^+ клеток каждого типа. Ph^+ клетки от разных больных, попадая в одинаковые условия суспензионной культуры и будучи изолированными от клеточного окружения *in vivo*, различаются регуляцией ПД. Это означает, что Ph^+ клетки от больных ХМЛ наследуют и воспроизводят в культуре функции исходных клеток от больных ХМЛ с особенностями их регуляции при участии онкогена *bcr/abl*, кодирующего тирозинкиназу p210. Последние, как известно для клеточных линий, активируют пролиферацию Ph^+ клеток, изменяют многие пути сигнальной трансдукции, осложняют регуляцию кроветворения и приводят к лейкозам: ХМЛ, ОМЛ и ОЛЛ [1; 5; 10; 12; 13; 17; 19–21; 23–33; 40]. Именно *bcr/abl* и p210 определяют туморогенность, активацию пролиферации и блокирование апоптоза Ph^+ клеток на клеточных линиях [12–14; 18; 21; 23; 30; 33; 36; 37; 39]. В работах [15; 16; 25; 35–37; 39] исследована роль разных мутантов p210 в клеточной пролиферации, туморогенности и апоптоза Ph^+ клеток, полученных трансфекцией генно-инженерными конструкциями с различными мутациями в онкогене *bcr/abl*.

Совокупность этих данных предполагает, что многообразие ХМЛ по диагностике, симптомам, отношению к терапии связано с вариациями структуры и функций онкогена *bcr/abl* и его продукта – тирозинкиназы p210, и что эти вариации, вероятно, отражаются в типах Ph^+ клеток и их ПД в культуре. С целью приблизиться к решению этой задачи мы в данной работе изучили кинетику ПД в культуре Ph^+ клеток 2 типа и роль созревания нейтрофилов с низкой эффективностью пролиферации в регуляции ПД.

Материалы и методы

Материалы и методы детально приведены в предыдущей статье [7].

Использованы материалы: гепарин (Flow, Англия); Limphoprep, среда α -МЕМ (MP Biomedical, США); DEPC, Hepes, Трис, PBS, эмбриональная бычья сыворотка (ЭБС), цитрат Na, лаурилсаркозил (ICN, США); краситель трипановый синий, L-глутамин и 2-меркаптоэтанол (Serva, Германия), пенициллин и стрептомицин (ОАО «Биохимик», Саранск, Россия); Г-КСФ (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Франция); PBS (10мМ фосфатный буфер + 0,13 М NaCl + 2,7 мМ KCl, pH 7,4) таблетированный, НПЦ «Эко-сервис», Россия.

Исследовали Ph^+ мононуклеары 2 типа выделенные из ПК и КМ от больных ХМЛ в ХФ до лечения и в процессе лечения. Характеристики Ph^+ клеток и больных ХМЛ, из ПК и КМ которых получены мононуклеары, даны в [7]. В Ph^+ клетках определены типы мРНК *bcr/abl*: b3a2, b2a2 или e1a2 с помощью метода RT-PCR как указано в [2]. Ph^+ мононуклеары из ПК и КМ больных ХМЛ получали, анализировали и культивировали как указано в [7].

Цитофлуориметрический анализ кинетических кривых апоптоза и распределения Ph^+ клеток в фазах клеточного цикла при культивировании Ph^+ клеток детально описан в сообщении I [7]. Измерения проводили в проточном флуориметре EPICS-XL. Клетки гранулоцитарного гейта анализировали с помощью прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния и одновременно регистрировали флуоресценцию FL2 пика по ампли-

туде и площади импульса (это позволяло отсекал слипшиеся клетки, конгломераты и обрывки клеток) в линейном и логарифмическом масштабе, определяя клетки в апоптозе. К клеткам, вышедшим в апоптоз, относили FL2-Н частицы с гиподиплоидным набором ДНК. Долю гранулоцитов, находящихся в апоптозе, определяли для клеток, анализируемых в гранулоцитарном гейте, где отсутствуют обрывки клеток. В тех же пробах Ph^+ клеток получали ДНК-гистограммы и в них анализировали распределение клеток по фазам клеточного цикла (S, G₂/M).

Кинетические кривые пролиферации Ph^+ лейкоцитов (кривая роста популяции Ph^+ клеток – в основном мононуклеаров) и их гибели получали согласно концентрации живых и мертвых клеток, которую и вычисляли по доле клеток при концентрации 10⁶ клеток/мл.

Кинетические кривые дифференцировки Ph^+ лейкоцитов и их субпопуляций: миелоидных клеток, лимфоцитов, гранулоцитов, и субпопуляций гранулоцитов: бластов, промиелоцитов, миелоцитов, метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов строили, вычисляя концентрацию соответствующих клеток в пробах по их доле, определяемой по морфологии на мазках, на 10⁶ клеток/мл. Детали см. [7]. Ошибка определения $\pm 5\div 11\%$. Кроме морфологии Ph^+ клетки от ХМЛ № 1.1 и № 2.6 идентифицировали по экспрессии антигенов CD с набором моноклональных антител как указано в работе [6], где приведены результаты идентификации и кинетики экспрессии антигенов. Результаты определений по экспрессии антигенов и морфологии совпадают.

Индекс эффективности P/D определяли как соотношение скоростей накопления клеток P, пролиферирующих с дифференцировкой, и клеток D, дифференцирующихся без деления, определяли по [7].

Результаты и обсуждение

Согласно [7] Ph^+ клетки разных больных ХМЛ представлены 3 типами, пролиферация и дифференцировка (ПД) которых в культуре отличается эффективностью, а также соотношением скоростей пролиферации клеток P и созревания нейтрофилов, клеток D. Ph^+ клетки 1 типа пролиферируют с высокой эффективностью, и больные ХМЛ с такими клетками предрасположены к быстрой прогрессии ХМЛ [7]. Повышенная эффективность пролиферации этих клеток при ПД согласуется с активной экспрессией онкогена *bcr/abl*, однако при этом нет ареста апоптоза [2; 7], который при ХМЛ по многим данным следовало бы ожидать [19–22; 31; 32; 35; 39]. Ко 2 типу отнесены Ph^+ клетки, ПД которых происходит с большей скоростью созревания (накопления созревающих без деления нейтрофилов, D клеток), чем скорость пролиферации (накопления пролиферирующих клеток P), и с низким индексом эффективности P/D ≤ 1 , при продолжительности этих условий ~ 5–9 сут [7]. Это видно по различиям в кинетических кривых ПД Ph^+ клеток (рис. 1–5, а–г соответственно). ПД клеток 2 типа по продолжительности сопоставима с циклом дифференцировки гемопоэтических клеток [8; 9; 38]. Клетки 2 типа были выделены из 9 образцов ПК и/или КМ больных ХМЛ в хронической фазе. Они составили ~ треть исследованных образцов Ph^+ мононуклеаров от больных ХФ ХМЛ [7]. Лейкоциты рассматривались и анализировались как клетки, составляющие основную часть Ph^+ мононуклеаров при ХМЛ [1; 5; 10]. Субпопуляции лейкоцитов включали миелоидные клетки, гранулоциты, лимфоциты, моноциты; субпопуляции гранулоцитов – бласты, промиелоциты, миелоциты, метамиелоциты (ММ), ПЯ и СЯ нейтрофилы; пролиферирующие клетки P – бласты + промиелоциты + миелоциты.

Созревающие клетки D включали ММ + ПЯ + СЯ. В данной работе, кроме перечисленных, анализировали кинетические кривые апоптоза и распределения Ph^+ клеток в фазах клеточного цикла. Характеристика образцов Ph^+ клеток 2 типа (моноклеаров) из КМ и ПК от больных ХФ ХМЛ даны в [7].

Сопоставление закономерностей кривых роста популяции лейкоцитов, дифференцировки лейкоцитов и гранулоцитов, у которых скорость созревания больше, чем скорость пролиферации при низком индексе эффективности $P/D \leq 1$ (рис. 1–5; табл.) показывает, что значительный рост клеточности лейкоцитов в 1,5–4 раза происходит не за счет активной пролиферации клеток, а за счет накопления в значительных концентрациях нейтрофилов, созревающих без деления, особенно СЯ. Нейтрофилы накапливаются при блокировании апоптоза и очень низком содержании пролиферирующих клеток и миелоцитов в том числе, т.е. популяция лейкоцитов увеличивается при ингибировании пролиферации Ph^+ клеток с уменьшением скорости и эффективности пролиферации по сравнению со скоростью созревания. Это означает, что при блокировании апоптоза нейтрофилы накапливаются в избытке, уменьшают скорость пролиферации и ингибируют пролиферацию клеток, из которых сами образуются, а также тормозят дифференцировку самих нейтрофилов в ряду СЯ, ПЯ и ММ при их значительной концентрации, вероятно, по механизму обратной связи.

Рассмотрим эти события на конкретных примерах. ПД Ph^+ клеток 2 типа протекает с низкой эффективностью – индексом $P/D \leq 0,2-1$ и со скоростью накопления нейтрофилов, созревающих без деления, D [зрелых], большей, чем скорость пролиферирующих Ph^+ клеток, P [незрелых]. Эффективность ПД – индекс P/D (соотношение скоростей накопления клеток пролиферирующих P и клеток D, созревающих без деления) колеблется от 0,2 до 1,6. Индексы $P/D \leq 0,2-1$, большие скорости созревания и следовательно повышенные концентрации нейтрофилов ($[z] > [nz]$) (см. рис. и табл.) сохраняются длительное время (5–9 сут) и по продолжительности сопоставимы с циклом дифференцировки функционирующего субклона гемопоэтических клеток, как и при ПД Ph^+ клеток 1 типа [7].

В начале культивирования в некоторых случаях на короткое время P/D больше 1. По мере накопления нейтрофилов и выяснения неспособности данных Ph^+ клеток к апоптозу P/D быстро снижается до 0,5–1,0 (рис. 2,2; 2,4 и 2,7). Это связано с отсутствием или низким содержанием нейтрофилов в свежывыделенных моноклеарах. Падение P/D наблюдается при накоплении СЯ и нейтрофилов, а рост P/D – при расхождении СЯ (рис. 2,1г; 2,2г; 2,3в; 2,4б, в; 2,5б–в; результаты для образцов Ph^+ клеток № 2,6 и 2,7 в табл.). На этих рисунках видно, что концентрация созревающих клеток существенно выше, чем пролиферирующих незрелых. По ходу кинетических кривых скорости накопления и концентрации зрелых и незрелых клеток, как и индекс эффективности P/D , постоянно изменяются.

Отметим, что Ph^+ клетки ХМЛ № 2,7 с $P/D = 1,5$ для клеток из КМ и ПК и 0,5 для цельной ПК в нулевой момент ПД отнесены к 2 типу условно на основании характера кривой роста и гибели клеток (см. рис. 5г). На кривых видно накопление зрелых, временная активная гибель клеток с последующим характерным скачкообразным торможением пролиферации нейтрофилами. Кривая роста популяции Ph^+ клеток из КМ на 2 сут подавляется при гибели 18% (мах на 1 сут), гибели 2–3% на 2–8 сут и 13% на 9 сут.

Далее видны 2 максимума гибели клеток на 3 и 7 сут с минимумом на 4 сут. Рост Ph^+ клеток из ПК ингибирован при подавлении гибели до 7–8 сут. Возможность реализации 3 типа Ph^+ клеток не исключена при длительном периоде ПД 2 типа.

Пролиферация Ph^+ клеток 2 типа

Из кривых пролиферации Ph^+ лейкоцитов и их дифференцировки (см. рис. 1–5; табл.) видно значительное увеличение концентрации клеток – от 1,5 до 4 крат. Однако увеличение клеток происходит не только в результате пролиферации клеток. Согласно кинетическим кривым дифференцировки основное увеличение клеточной массы определяет накопление нейтрофилов, созревающих без деления (см. рис. 1–5).

Основная характеристика пролиферации – распределение Ph^+ гранулоцитов 2 типа по фазам клеточного цикла ($S+G_2/M$) показывает, что их распределение изменяется по ходу ПД, оно зависит от источника Ph^+ клеток – больного ХМЛ. То, что доля пролиферирующих Ph^+ клеток в фазах $S+G_2/M \leq 20-40\%$, а в G_2/M фазах $\sim 15\%$ видно на рис. 2,1 в, 2,2 г.

Другой показатель активности пролиферации – отношение $S/(G_2+M)$ равен 1,2. Видно, что максимальная доля клеток в $S+G_2/M$ фазе достигает 43% а в S фазе $\sim 30\%$ на 1 сутки и быстро понижается до 12%. Индекс P/D при этом 0,6–0,8 (рис. 2,2 в). Доля пролиферирующих клеток на рис.2 близка таковой Ph^+ клеток 1 типа [7]. Однако длительность существования повышенной доли клеток в фазах $S+G_2/M$ у Ph^+ клеток 2 типа оказывается значительно короче (падает через 1 сут), чем при активной пролиферации Ph^+ клеток 1 типа. Доля последних в фазах $S+G_2/M \geq 43\%$ поддерживается почти 6 сут. При этом отношение $S/(G_2+M) \sim 2,4-2,7$ и индекс эффективности P/D 1,2–1,6. Это для ПД Ph^+ клеток 2 типа означает преимущество созревания над пролиферацией, которую подавляют нейтрофилы, скорость созревания которых оказывается выше скорости пролиферации.

Отметим, что при культивировании доля активно пролиферирующих злокачественных клеток K562, производных БК ХМЛ, в фазах $S+G_2/M$ достигает $44 \pm 3\%$ и мало изменяется в течение 7 сут, а отношение $S/(G_2+M)$ достигает 4,4 (результаты публикуются отдельно). Колебания доли пролиферирующих клеток отмечена ранее при острых лейкозах [11].

Несмотря на ингибирование пролиферации Ph^+ клеток 2 типа на 1–2 сут заметно активизируется, затем уменьшается (на 3–5 сут). На границе 1 и 2 циклов ПД (на 6–8 сут) вновь наблюдается вторая, но более слабая активация пролиферации (рис. 3г, 4а). Перед второй активацией пролиферации на кривой (рис.3 в) видно значительное уменьшение концентрации всех клеток (незрелых и зрелых, миелоцитов и СЯ) и рост индекса P/D .

Итак, ПД Ph^+ клеток 2 типа характеризуется низким индексом $P/D < 1$ и содержанием пролиферирующих Ph^+ клеток в фазах клеточного цикла $S+G_2/M < 20-40\%$ с укороченной продолжительностью пролиферации (менее 2–3 сут).

Дифференцировка Ph^+ клеток, апоптоз и накопление сегментоядерных нейтрофилов

Кинетические кривые дифференцировки Ph^+ лейкоцитов показывают $\sim 80\%$ содержание гранулоцитов, но миелоцитов в их субпопуляциях не более 25%. Содержание зрелых нейтрофилов, особенно СЯ (рис. 1–5), весьма велико. В процессе дифференцировки СЯ активно накапливаются и мало расходуются.

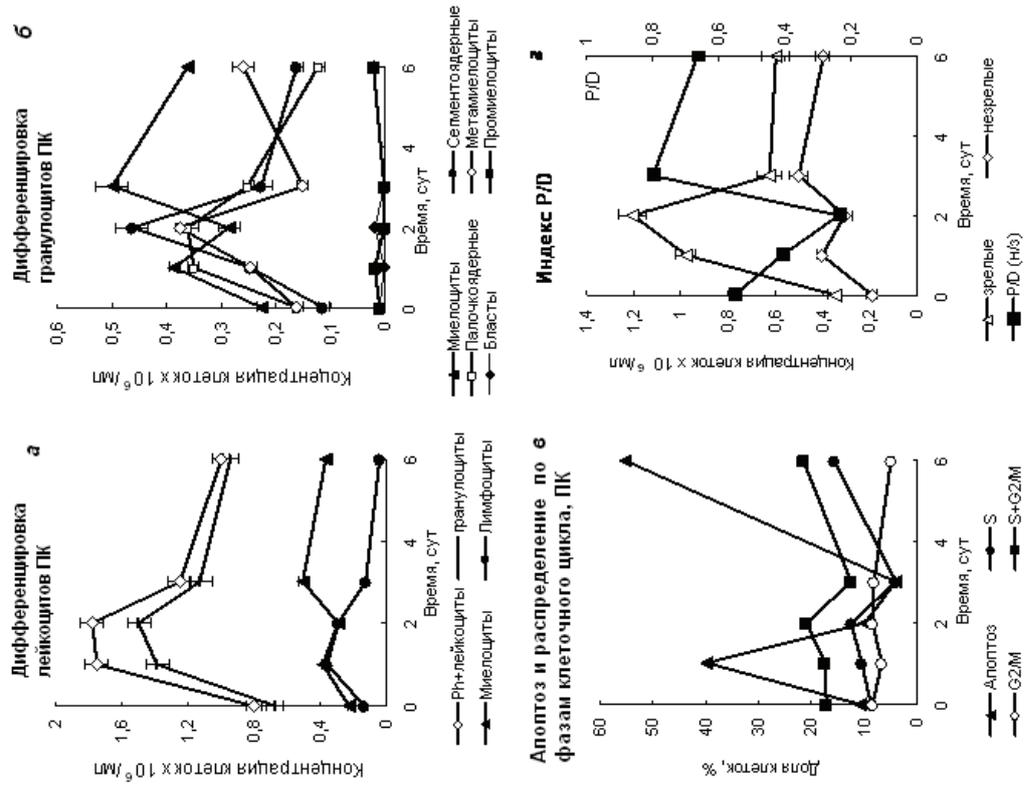


Рис. 1. Кинетические кривые дифференцировки P^{h} мононуклеаров ПК от ХФ ХМЛ № 2,1 в культуре. Дифференцировка субпопуляций лейкоцитов (а), гранулоцитов (б), распределение гранулоцитов по фазам клеточного цикла и апоптоз гранулоцитов (в), индекс эффективности деления (г), накопление пролиферирующих клеток (Р [нз]), и нейтрофилов, созревающих без деления (D [з]), (г).

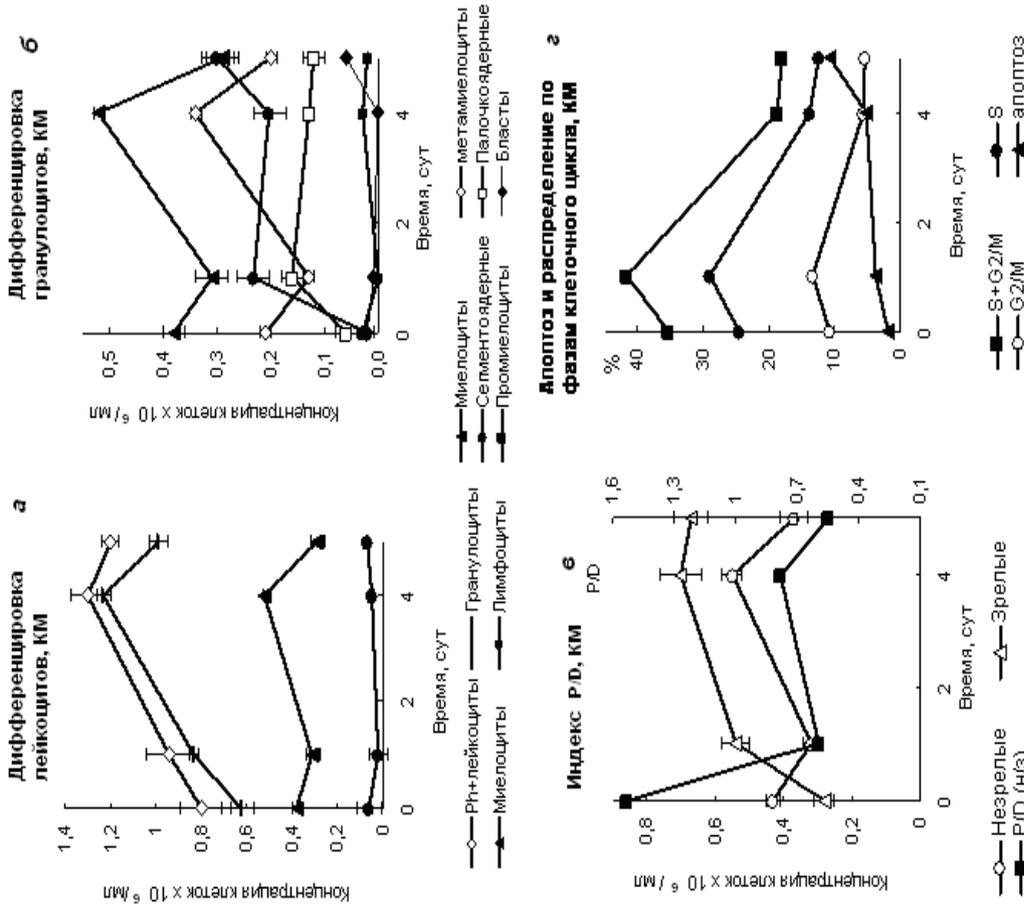


Рис. 2. Кинетические кривые дифференцировки P^{h} мононуклеаров из КМ от ХФ ХМЛ № 2,2 в культуре. Лейкоциты и гранулоциты (а-б), индекс эффективности деления (в), накопление пролиферирующих клеток и созревающих нейтрофилов (в), распределение гранулоцитов в фазах клеточного цикла и апоптоз гранулоцитов (г).

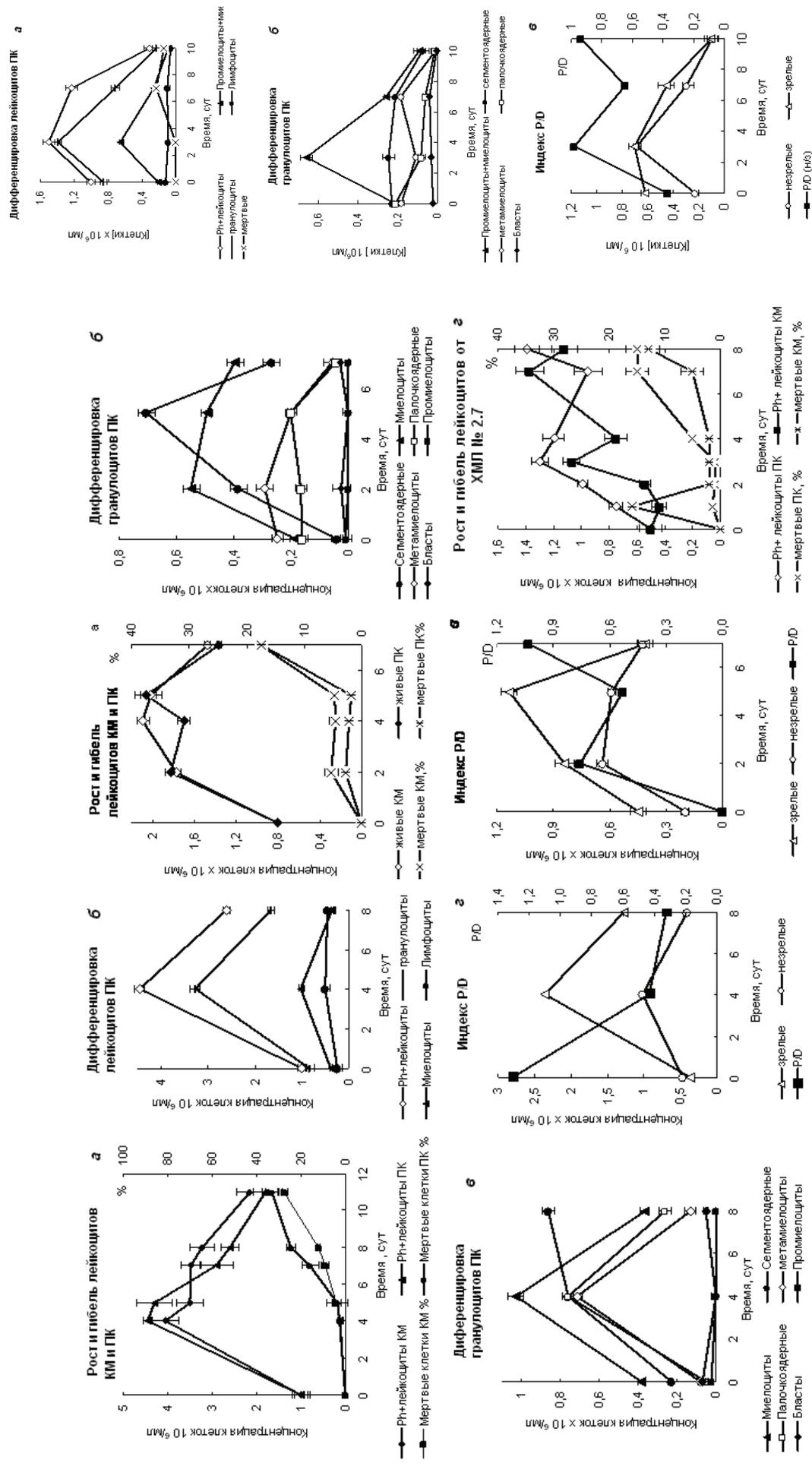


Рис. 3. Кинетические кривые дифференцировки Rh^+ мононуклеаров из ПК от ХФ ХМЛ № 2,3 в культуре. Лейкоциты и гранулоциты (а-б), индекс эффективности P/D , накопление пролиферирующих клеток и созревающих нейтрофилов (в).

Рис. 4. Кинетические кривые роста и гибели Rh^+ мононуклеаров из ПК (а) от ХФ ХМЛ № 2,4 и дифференцировки субпопуляций мононуклеаров из ПК в культуре (б-г). Дифференцировка лейкоцитов и гранулоцитов (б, в), индекс эффективности P/D (г), накопление пролиферирующих клеток и нейтрофилов, созревающих без деления (г).

Рис. 5. Кинетические кривые роста и гибели Rh^+ мононуклеаров из КМ и ПК от ХФ ХМЛ № 2,5 и дифференцировки гранулоцитов из ПК (б) в культуре. Индекс эффективности P/D , накопление пролиферирующих клеток и созревающих нейтрофилов (в). Рост и гибель лейкоцитов от ХМЛ № 2,7 (г).

Рис. 6. Кинетические кривые роста и гибели Rh^+ мононуклеаров из ПК от ХФ ХМЛ № 2,3 в культуре. Лейкоциты и гранулоциты (а-б), индекс эффективности P/D , накопление пролиферирующих клеток и созревающих нейтрофилов (в).

Максимальная концентрация СЯ в 2 раза больше, чем миелоцитов (см. рис. 1б, 5б–в; табл.). Это дополнительно указывает на роль зрелых клеток, особенно СЯ, в регуляции ПД Ph^+ гранулоцитов 2 типа. Характеристики клеток 2 типа (см. табл.) свидетельствуют о повышенном в отдельных случаях отношении blastов к миелоцитам (Б/М) в 20 раз (0,01–0,21). Соотношение [СЯ]/[М], обычно малая величина, при ПД клеток 2 типа увеличивается, становится более единицы и тоже демонстрирует накопление СЯ нейтрофилов, синхронное ингибированию накопления миелоцитов.

Накопление зрелых по определению падает в ряду СЯ>ПЯ>ММ [10]. Их максимальное накопление на 2 или 4 сутки (рис. 2, 1б, г; 2.4 в–г) соответствуют минимальному накоплению миелоцитов и низкому индексу P/D. На рис. 1–5 виден рост индекса P/D при уменьшении на 4-е сут концентрации нейтрофилов. Содержание миелоцитов составляет при этом всего ~1/4 от всех Ph^+ лейкоцитов, приближая его к содержанию каждого из нейтрофилов или ниже.

На рис. 1б–в; 5б–в; 4 в, г видно, что при 2 типе дифференцировки Ph^+ клеток СЯ нейтрофилы способны накапливаться отдельным пиком с максимумом на 2–6 сутки (при [СЯ] > 0,2–0,3×10⁶/мл), которому соответствует низкий апоптоз и минимум накопления миелоцитов (рис. 1б–в). При этом кривая накопления миелоцитов прерывается на время значительного накопления СЯ (максимум на 2 сут), а индекс P/D, как следствие, понижается. При этом пролиферация миелоцитов подавлена до тех пор, пока не снизится концентрация СЯ в результате апоптоза, что наблюдается по согласующимся по времени кинетическим кривым расходования СЯ и роста апоптоза гранулоцитов (или общей гибели Ph^+ клеток). После гибели значительной части СЯ закономерность накопления популяции миелоцитов восстанавливается, а индекс P/D увеличивается (рис. 1б–в). Такая зависимость воспроизводится на кривой роста Ph^+ лейкоцитов от ХМЛ № 2,7 (табл.). Этот пример отнесен к 2 типу Ph^+ клеток по характеру кривых роста и гибели Ph^+ клеток с падением скорости пролиферации клеток с ее ингибированием во время активного созревания нейтрофилов.

На рис. 2б–г максимум накопления СЯ на 1 и 5 сут также соответствует минимуму накопления миелоцитов, уменьшению P/D и активации гибели клеток в этот период. Аналогичная активация накопления СЯ (на 2–5 сут), как видно на рис. 5б–в, подавляет накопление миелоцитов, понижает P/D. Гибель СЯ на 5 сут восстанавливает рост концентрации миелоцитов и величину P/D. На рис. 2б видно, что максимум накопления СЯ соответствует минимуму накопления миелоцитов (т.е. максимальному расходованию миелоцитов). Максимумы накопления СЯ и апоптоза при этом совпадают (см. рис. 1б–в). Ингибирование накопления миелоцитов заметно при повышении концентрации СЯ > 0,2–0,3×10⁶ клеток /мл, что видно на рис. 1б; 2б; 5б–в; 3б и частично на рис. 4в.

Поскольку последовательность нейтрофилов, созревающих без деления, по определению представлена превращением М→ММ→ПЯ→СЯ с выходом СЯ в апоптоз, то в культуре в отсутствие возможности транспорта в другие ткани, СЯ должны погибнуть по механизму апоптоза и, следовательно, значительное накопление СЯ указывает на блокирование апоптоза. Общая концентрация нейтрофилов в максимуме весьма высокая (0,7–2,4)×10⁶/мл при колебании содержания каждого из них (табл.). Это согласуется с полученными результатами и объясняет пониженное содержание миелоцитов при дифференцировке Ph^+ клеток 2 типа.

При концентрации СЯ ≤ 2–3×10⁵ клеток/мл и повышенном пуле клеток в S+G2/M фазах наблюдается

весьма низкий апоптоз (< 5–10 %). На 5 сут он едва достигает 10 % (см. рис. 2б, г). Гибель клеток в других случаях (рис. 5а–в), определяемая окрашиванием с трипановым синим, также выявляет ингибирование гибели клеток. При концентрации СЯ выше 0,2–0,3×10⁶ клеток /мл кинетические кривые дифференцировки Ph^+ клеток 2 типа указывают на большую скорость накопления СЯ по сравнению со скоростью апоптоза и накопления миелоцитов, и тем большую, чем выше концентрация СЯ. На рис. 1б, в видно, что вначале апоптоз достигает максимума в 40 % на 1 и 60 % – на 6 сут, что соответствует увеличению накопления миелоцитов (см. рис. 1б). В случаях КМ (см. рис. 2–4) и ПК (табл., ХМЛ № 2,6) апоптоз не превышает 10–20 %.

Вероятно, ингибирование накопления миелоцитов зависит не прямо от блокирования апоптоза, а опосредовано СЯ клетками, накапливающимися вследствие ареста апоптоза. Это явление противоположно условиям индукции апоптоза при истощении в среде цитокинов, отсутствие которых в норме стимулирует апоптоз [3; 4; 12; 13; 29; 30].

В совокупности приведенные результаты позволяют заключить, что низкая эффективность ПД Ph^+ клеток 2 типа определяется блокированием апоптоза, значительным накоплением нейтрофилов, особенно СЯ, ингибированием ими пролиферации Ph^+ клеток и в частности – миелоцитов, вероятно, по механизму обратной связи. Ингибирование пролиферации Ph^+ клеток 2 типа нейтрофилами СЯ присутствует во всех рассмотренных примерах ПД Ph^+ клеток 2 типа и свидетельствует об участии СЯ в регуляции ПД. Эти результаты хорошо согласуются с данными о раздельном проявлении трансформирующей и антиапоптотической активности различных мутантов тирозинкиназы p210 bcr/abl благодаря изменениям путей сигнальной трансдукции с участием p210 [19; 22; 34; 36].

Инверсия порядка (последовательности) накопления неделящихся нейтрофилов

Нейтрофилы, созревающие без деления (клетки D), по определению дифференцируются в ряду:

М→ММ→ПЯ→СЯ с выходом СЯ в апоптоз.

При одинаковых скоростях их дифференцировки можно ожидать тот же порядок накопления клеток этих субпопуляций. В отдельных случаях ПД такой порядок соблюдается. Однако в рассматриваемых кинетических кривых ПД Ph^+ клеток 2 типа порядок накопления созревающих без деления нейтрофилов изменяется. Скорость достижения максимумов на кинетических кривых СЯ, ПЯ и ММ замедляется, а накопление миелоцитов в области пиков нейтрофилов понижается. В максимуме накопления нейтрофилов наблюдается инверсия порядка накопления нейтрофилов. Последовательные изменения порядка накопления нейтрофилов по ходу дифференцировки видны на рис. 1–5.

Так, на рис. 1б, ряд М>ПЯ>ММ~СЯ на 1 сут последовательно инвертирует в СЯ>ММ~ПЯ>М на 2 сут, в М>ПЯ~СЯ>ММ на 3 сут и в ряд М>ММ>СЯ>ПЯ на 6 сут. На этом рис. видны частые изменения порядка с увеличением или уменьшением скорости накопления нейтрофилов, что показывают пересечения кривых с изменением их направления. Одинаковые скорости накопления нейтрофилов на пересечении кривых на 4,5 сут позже приводят почти к обычному порядку накопления нейтрофилов – М>>ММ>СЯ>ПЯ. На рис. 2б видны: обычный порядок накопления – М>ММ>ПЯ>СЯ в нулевой момент культивирования, инверсия порядка в М>СЯ>ПЯ~ММ на 1 сут, в М>>ММ>СЯ>ПЯ на 4 сут и позже к накоплению СЯ при убыли М, ММ и ПЯ. На рис. 3б порядок накопления М>>СЯ>ММ~ПЯ на 3 сут инвертирует в М~СЯ~ММ>ПЯ на 7 сут.

Таблица

Характеристика пролиферации и дифференцировки Ph^+ клеток 2 типа в культуре. Скорости накопления и концентрация созревающих нейтрофилов больше, чем таковые пролиферации клеток, [зрелых] > [незрелых], поддерживаются в течение 6–9 сут.

№ пп, № рис.	№ образца ПК или КМ ХМЛ	Рост числа Ph^+ клеток макс крат	P/D, ⁺ [нз]/[з]	[Нейтрофилов] = [зрелых], $10^6/мл$ макс	[СЯ]/[Миелоциты] ⁺	[Бласты]/[Миелоциты] ⁺	Апоптоз/гибель/клеток, % макс (на сут)
1/1	2,1 ПК	2,2	0,3-0,8	1,21	0,5-1,7-0,5	0-0,06	40 и 55 (1 и 6 сут)
2/2	2,2 КМ	1,6	0,8-1,5	0,7	0,05-0,2-0,42	0,03-0,21	4 и 11 (2 и 5 сут)
3/3	2,3 ПК	1,5	0,4-1,0	0,71	1,1-0,25	0,15	70 и 34/ (4 и 10 сут)
4/4	2,4 ПК	4,0	3-1,2	2,36	0,5-2	0,06	73/ (11 сут)
5/5	2,5 ПК	2,5	0,1-1,1-1,6	1,13	0,67-0,25-1,43	0,1-0,2	5,3 и 17,4/ (2 и 7 сут)
6 7	2,6 ПК КМ	–	0,2-1,0 0,3 -1,0	1,5	1,67-0,36-2 1,67-0,43- 0,33-2	0,03 0,14	3,2 и 23,8/ (8 и 11 сут)
8* 9*	2,7 КМ ПК исходная ПК**	2,8 2,7	1,5 1,5 0,4	0,15 0,15 0,66	0,17 0,1 0,93	0,19 0,05 0,04	16 и 13/ (1 и 8 сут) 1,5 и 15/ (1 и 7 сут) –

□ – концентрация. Все Ph^+ мононуклеары 2 типа выделены из КМ или ПК больных ХМЛ в хронической фазе. Характеристика Ph^+ клеток и больных ХМЛ, а также типы мРНК *bcr/abl* приведена в [7].

* Ph^+ клетки отнесены к 2-му типу условно по кривым роста и гибели клеток, на которых видно асинхронное накопление зрелых клеток и их гибели с характерным скачкообразным торможением пролиферации.

Индекс P/D определен только для начала культивирования.

**ПК до выделения мононуклеаров.

†Даны интервалы изменения показателей по ходу кинетических кривых.

На рис. 4в почти равные скорости накопления 3 нейтрофилов на 4 сут: М>ПЯ~СЯ~ММ, на 8 сут инвертируют в ряд СЯ>>М>ПЯ> ММ. На рис. 5б скорость накопления М>СЯ>ММ>ПЯ на 4 сут инвертирует в СЯ>М >>ММ ~ПЯ на 8 сут.

Совокупность этих результатов означает, что изменения порядка накопления, т.е. скоростей накопления нейтрофилов в сумме и относительно друг друга (или относительно миелоцитов), происходят достаточно часто по ходу кинетических кривых накопления нейтрофилов. Восстановление обычного порядка накопления нейтрофилов соответствует повышению содержания миелоцитов и индекса эффективности P/D, т.е. способствует ускорению пролиферации. Изменение скорости и инверсия порядка накопления нейтрофилов, будучи синхронно уменьшению индексов эффективности P/D (см. рис. 1 и 4г; 2, 3 и 5б), указывает на непосредственное участие нейтрофилов в регуляции ПД Ph^+ клеток 2 типа с ингибированием их пролиферации.

В итоге ПД Ph^+ клеток 2 типа происходит с низким индексом эффективности P/D ≤ 1 и невысокой долей пролиферирующих Ph^+ клеток в фазах клеточного цикла $S+G_2/M \leq 20-40\%$ и/или с укороченным временем существования клеток в этих фазах. ПД Ph^+ клеток 2 типа сопровождается ингибированием апоптоза и значительным накоплением нейтрофилов, особенно СЯ, пониженным накоплением миелоцитов с заметным ингибированием пролиферации Ph^+ клеток, а также инверсией первоначального порядка накопления созревающих без деления нейтрофилов. Последние в условиях блокирования апоптоза опередают клеточную регуляцию пролиферации Ph^+ клеток и нарушают регуляцию своего созревания.

Инверсия порядка накопления нейтрофилов при ПД в условиях созревания Ph^+ клеток обнаружена впервые. Она оказывается еще одним интересным свойством ПД Ph^+ клеток 2 типа в культуре.

Очевидно, что накопление СЯ в результате блокирования апоптоза по цепочке обратной связи ведет к последовательному накоплению предыдущих по ходу дифференцировки нейтрофилов ПЯ и ММ и к нарушению регуляции созревания самих нейтрофилов: накопление СЯ ведет к ингибированию созревания ПЯ, а ПЯ, в свою очередь, угнетают дифференцировку ММ. В конце концов, тормозится вся цепь созревания нейтрофилов, что сопровождается накоплением избытка всех нейтрофилов.

При этом созревающие нейтрофилы D угнетают пролиферацию и подавляют эффективность ПД. В следующий контрольный период индуцируется апоптоз или увеличивается его скорость, возможно, благодаря восстановлению индукции апоптоза в отсутствие цитокинов или выработкой цитокинов самими Ph^+ клетками.

Индукция апоптоза освобождает нейтрофилы от пресса обратной связи с торможением созревания, восстанавливает порядок накопления созревающих нейтрофилов, их концентрация падает, пролиферация клеток активируется, индекс эффективности P/D растет и регуляция пролиферации и созревания Ph^+ клеток восстанавливается.

Таким образом, в культуре первичных Ph^+ клеток 2 типа, происходящих от разных больных ХМЛ с их индивидуальными мутациями в гене *bcr/abl*, обнаружена клеточная регуляция пролиферации и дифференцировки нейтрофилами, созревающими без деления и накапливающимися из-за ареста апоптоза.

При этом ингибируется пролиферация Ph^+ клеток и нарушается регуляция созревания нейтрофилов, в которой участвует инверсия порядка созревания не-пролиферирующих нейтрофилов.

Отметим, что в регуляции ПД Ph^+ клеток 2 типа можно выделить ряд взаимозависимых процессов, синхронно и асинхронно протекающих. Так, ингибирование апоптоза с накоплением нейтрофилов, созревающих без деления, происходит асинхронно накоплению миелоцитов и индукции апоптоза. Накопление миелоцитов синхронно индукции апоптоза, активации пролиферации с ростом индекса P/D и восстановлению регуляции созревания и пролиферации.

Кинетически кривые роста числа Ph^+ лейкоцитов (моноклеаров) 2 типа лишь частично отражают их пролиферацию, так как число Ph^+ клеток популяцией значительно увеличивается за счет накопления зрелых нейтрофилов при блокировании их апоптоза. Отсюда ясно, что определение лейкоцитоза недостаточно для выявления Ph^+ клеток 2 типа при ХМЛ. Можно предположить, что, теряя способность выходить в апоптоз и накапливая созревающие без деления нейтрофилы в процессе ПД, Ph^+ клетки 2 типа способствуют торможению прогрессии ХМЛ. Действительно, Ph^+ клетки 2 типа были выделены из КМ и ПК больных исключительно в хронической фазе ХМЛ. При клинических наблюдениях за этими больными (более 3–8 лет) отмечены длительные клинико-гематологические и цитогенетические ремиссии, и не встречалось быстрой прогрессии ХМЛ из ХФ в ФА и БК [7].

Способность онкогена *bcr/abl*, и тирозинкиназы p210 определять туморогенные свойства, повышать жизнеспособность, активировать пролиферацию и блокировать апоптоз в линиях Ph^+ клеток детально исследовалась в [12–14; 16; 17; 19; 21; 29–31; 34–37; 39]. Экспрессия *bcr/abl* и p210 необходимы для обеих функций и даже как будто реализуют их одновременно. Для культур первичных Ph^+ клеток от больных ХМЛ соотношения активации пролиферации и ингибирования апоптоза более сложные, чем для клеточных линий. Несогласованность данных объясняют тонкими различиями в регуляции клеточных линий и первичных Ph^+ клеток [16; 17–19; 21; 22; 35; 39–41] и, как мы теперь видим, зависит от типа Ph^+ клеток, различающихся у разных больных ХМЛ.

В работе [17] при исследовании разных мутантов p210 показано, что функции p210 в активации пролиферации и ингибировании апоптоза проявляются раздельно и обзаны разным мутациям в *bcr/abl*, в том числе отвечающим за разные изменения в сигнальной трансдукции с фосфорилированием киназой p210 дополнительных белков.

Регуляция ПД ингибированием пролиферации Ph^+ клеток созревающими нейтрофилами, накапливающимися при блокировании апоптоза в Ph^+ клетках 2 типа, а также индукция апоптоза в Ph^+ клетках 1 типа, способствующая эффективной пролиферации в отсутствие нейтрофилов [7], хорошо согласуются с изложенными выше представлениями о роли p210 и его мутаций в функционировании Ph^+ клеток. Эти результаты также объясняют противоречия в регуляции пролиферации и ингибировании апоптоза в первичных клетках от больных ХМЛ. Обнаруженное здесь существование разных типов Ph^+ клеток у разных больных ХМЛ с блокированием апоптоза или без блокирования снимают эти противоречия.

Ранее высказанная альтернативная гипотеза возникновения и прогрессии ХМЛ в качестве причины ХМЛ рассматривает не активацию пролиферации Ph^+ клеток из-за неуправляемой экспрессии p210 *bcr/abl*, а дисбаланс самоподдержания стволовых клеток и более

позднего созревания клеток. Основанием служат данные о том, что при ХМЛ клетки-предшественники образуются в меньшем количестве, чем в норме (или не больше), а их зрелых потомков в норме меньше, чем при ХМЛ [16; 18; 19; 40; 41].

Нарушение регуляции созревания Ph^+ клеток в качестве первичного биологического дефекта при ХМЛ рассматривали в ряде работ и ранее [17; 40]. Как видно из наших результатов такая регуляция ПД осуществляется устойчивыми к апоптозу СЯ нейтрофилами – потомками пролиферирующих клеток, активируемых *bcr/abl*, для Ph^+ клеток 2 типа, встречающихся у трети больных ХМЛ.

Отметим, что внутри 2 типа Ph^+ клетки также различаются количественными характеристиками P/D, ингибирования апоптоза, накопления СЯ и степенью ингибирования пролиферации по ходу ПД. Эти изменения можно рассматривать как некоторую регуляцию ПД в пределах, ограниченных условиями ПД Ph^+ клеток 2 типа, когда скорость созревания больше скорости пролиферации.

В работе [33] определена доля пролиферирующих Ph^+ клеток в фазах S+G₂/M клеточного цикла для субпопуляций Ph^+ клеток от больных в ХФ ХМЛ, выделенных цитофлуориметрически на сортере и экспрессия онкогена *bcr/abl* в этих клетках. Доля пролиферирующих миелоидных CD34 клеток > 20%, миелоцитов и метамиелоцитов ~ 5 %, ПЯ+СЯ нейтрофилов < 3 %. Экспрессия онкогена *bcr/abl* была максимальной у CD34 предшественников и у смеси миелоцитов с метамиелоцитами. В ПЯ+СЯ нейтрофилах экспрессия *bcr/abl* – в два раза меньше; в миелобластах и промиелоцитах экспрессия имела промежуточное значение.

Однако линейная корреляция пула пролиферирующих клеток и экспрессии онкогена для Ph^+ клеток 9 больных в ХФ ХМЛ оказалась прямой для CD34 клеток, миелобластов и промиелоцитов.

Для клеток более позднего созревания корреляция инвертировалась. В данных корреляции [33] инвертирование корреляции можно оценить, скорее всего, как обратное пропорциональную зависимость. Это означает, что накопление пула пролиферирующих Ph^+ клеток в S+G₂/M фазах пропорционально экспрессии *bcr/abl* только при пролиферации. При созревании (от миелоцитов до СЯ) доля клеток в S+G₂/M фазах и экспрессия онкогена оказываются обратно пропорциональными. Кинетика в этой работе не изучалась, а использовались усредненные данные для 9 больных в ХФ ХМЛ, полученные для одной точки Ph^+ клеток от каждого больного.

Результаты данной работы хорошо объясняют причину инверсии корреляции в работе [33], которой является, согласно нашим данным, изменение регуляции пролиферации по мере созревания с накоплением нейтрофилов из-за блокирования апоптоза, и с ингибированием пролиферации нейтрофилами. Совокупность результатов работы [33] и нашей свидетельствуют о парадоксальном механизме действия *bcr/abl* на Ph^+ клетки. Экспрессия онкогена *bcr/abl* в пролиферирующих миелоидных Ph^+ клетках-предшественниках активирует пролиферацию, а затем позже созревающие без деления Ph^+ нейтрофилы, наследующие тот же онкоген *bcr/abl*, ингибируют его эффект, первоначально активирующий пролиферацию в клетках предшественника.

Таким образом при ПД Ph^+ клеток 2 типа активирующий пролиферацию эффект экспрессии онкогена *bcr/abl* в Ph^+ клетках ранней дифференцировки подавляется экспрессией того же онкогена в Ph^+ клетках более позднего созревания.

Выводы

1. Пролиферация и дифференцировка (ПД) Ph^+ клеток 2 типа (моноклеаров) длительно протекает с большей скоростью созревания, чем скорость пролиферации. Индекс эффективности этих клеток $P/D = 0,2 - 1$ при невысокой доле пролиферирующих Ph^+ клеток в фазах $S+G_2/M$ клеточного цикла и/или укороченным временем существования клеток в этих фазах.
2. Пролиферация и дифференцировка Ph^+ клеток 2 типа сопровождается значительным ингибированием апоптоза, существенным накоплением СЯ нейтрофилов и ингибированием пролиферации. Блокирование апоптоза с накоплением нейтрофилов, созревающих без деления, происходит асинхронно накоплению миелоцитов, индукции апоптоза и росту индекса эффективности P/D .
3. При ПД Ph^+ клеток 2 типа обнаружена инверсия первоначального порядка (последовательности) накопления нейтрофилов: порядок $M > MM > ПЯ > СЯ$ последовательно инвертирует в ряд $СЯ > ПЯ > MM > M$, что ведет к постепенному накоплению всех нейтрофилов и нарушению регуляции созревания нейтрофилов, вероятно, по механизму обратной связи.
4. Повышенная концентрация созревающих нейтрофилов при ПД Ph^+ клеток 2 типа в условиях блокирования апоптоза опосредуют регуляцию пролиферации Ph^+ клеток и созревания самих нейтрофилов.
5. Значительный рост популяции Ph^+ клеток 2 типа при ПД отражает неравномерное накопление зрелых нейтрофилов в большей степени, чем пролиферацию Ph^+ клеток.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, грант № 06-04-08372-офи.

Литература

1. Абдулкадыров К.М., Бессмельцев С.С., Рукавицын О.А. Хронический миелолейкоз. – СПб: Специальная литература, 1998. – 463 с.
2. Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Саркисян Г.П. и др. Кинетика пролиферации, дифференцировки и транскрипции генов, регулирующих апоптоз, BCR/ABL+ Ph^+ клеток человека в культуре // Цитология – 2007. – Т. 49. – С. 889–900.
3. Владимирская Е.Б. Механизмы апоптоза клеток крови // Лабораторная медицина. – 2001. – № 4. – С. 47–54.
4. Владимирская Е.Б. Апоптоз и его роль в развитии опухолевого роста. В кн. Биологические основы противоопухолевой терапии. – М.: Изд. Агат-Мед, 2001. – С. 5–32.
5. Руководство по гематологии. Под ред. А.И. Воробьева. – Т. 1. – М: Ньюдиамед, 2002. – 280 с.
6. Гринева Н.И., Барышников А.Ю., Герасимова Л.П. и др. Кинетика экспрессии антигенов в процессе пролиферации и дифференцировки Ph^+ клеток периферической крови при хроническом миелолейкозе в культуре // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 21–32.
7. Гринева Н.И., Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П. и др. Различия в пролиферации и дифференцировке Ph^+ клеток от разных больных ХМЛ в культуре. I. Три типа Ph^+ клеток при ХМЛ. Пролиферация и дифференцировка Ph^+ клеток с высокой эффективностью // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8. – С. 53–68.
8. Козинец Г.И., Котельников В.М. Кинетика гемопоэза и ее клиническое значение // Советская медицина. – 1983. – № 4. – С. 3–77.
9. Котельников В.М., Козинец Г.И., Касаткина В.В., Ковалевская Н.П. Кинетика гранулоцитопоэза. В кн. Кинетические аспекты гемопоэза. Изд. Томского государственного университета, 1982. – С. 149–211.
10. Розмарин А.Д. Лейкоциты. В кн.: Шиффман Ф.Д. Патофизиология крови. VINOM Publishers, 2000. – С. 123–48.
11. Шмаров Д.А., Кучма Ю.М., Козинец Г.И. Изменение стабильности параметров клеточного цикла клеток костного мозга при гематологических заболеваниях // Терапевт. Архив. – 1997. – № 7. – С. 17–21.
12. Amarante-Mendes G.P., Naekyung Kim C., Liu L. et al. Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3 // Blood. – 1998. – 91. – P. 1700–5.
13. Bedi A., Zehnbaauer B.A., Barber J. et al. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents // Blood. – 1994. – 83. – P. 2038–44.
14. Bedi A., Barber J.P., Bedi G.C. et al. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in CML // Blood. – 1995. – 86. – P. 1148–58.
15. Brandford S., Rudzki Z., Walsh S. et al. High frequency of point mutations clustered within ATP-binding region in CML or Ph^+ AML patients who develop imatinib resistance // Blood. – 2002. – 99. – P. 3472–5.
16. Buckle A.M., Mottram R., Pierce A. et al. The effect of Bcr-Abl protein tyrosine kinase on maturation and proliferation of primitive haematopoietic cells // Mol. Med. – 2000. – 6(10). – P. 892–902.
17. Clarkson B., Strife A. Linkage of proliferative maturational abnormalities in CML and relevance to treatment // Leukemia. – 1993. – 7. – P. 1683–721.
18. Coppo P., Bonnet M.L., Dusanter-Fourt I. et al. Constitutive and specific activation of STAT3 by BCR-ABL in embryonic stem cells // Oncogene. – 2003. – 22(26). – P. 4102–10.

19. Cortez D., Kadlec L., Pendergast A.M. Structural and signaling requirements for bcr-abl mediated transformation and inhibition of apoptosis // *Mol. cell. biology.* – 1995. – 10. – P. 5531–41.
20. Deininger M.W.N., Goldman J.M., Melo J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia // *Blood.* – 2000. – 96. – P. 3343–56.
21. Deininger M.W.N., Vieira S., Mendiola R. et al. BCR/ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia // *Cancer research.* – 2000. – 60. – P. 2049–55.
22. Dublez L., Eymin B., Sordet O. et al. ABL delays apoptosis upstream of procaspase-3 activation // *Blood.* – 1998. – 91. – P. 2415–22.
23. Era T., Witte O.N. Regulated expression of P210 Bcr-Abl during embryonic stem cell differentiation stimulates multipotential progenitor expansion and myeloid cell fate // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2000. – 97. – P. 1737–42.
24. Guzman M.L., Jordan C.T. Considerations for targeting malignant stem cells in leukemia // *Cancer Control.* – 2004. – 11(2). – P. 97–104.
25. Holyoake T.L., Jiang X., Eaves A.C., Eaves C.J. Elucidating critical mechanisms of deregulated stem cell turnover in the chronic phase of chronic myeloid leukemia // *Leukemia.* – 2002. – 16. – P. 549–58.
26. Holyoake T.L., Jiang X., Jorgensen H.G. et al. Primitive quiescent leukemic cells from patients with chronic myeloid leukemia spontaneously initiate factor-independent growth in vitro in association with up-regulation of expression of interleukin-3 // *Blood.* – 2001. – 97. – P. 720–8.
27. Jaiswal S., Traver D., Miyamoto T. et al. Expression of BCR/ABL and BCL-2 in myeloid progenitors leads to myeloid leukemias // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2003. – 100. – P. 10002–7.
28. Jamieson C.H.M., Ailles L.E., Dylla S.J. et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast crisis CML // *New England J Medicine.* – 2004. – 351. – P. 657–67.
29. Lotem J., Sachs L. Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes // *Leukemia.* – 1996. – 10. – P. 925–31.
30. Lugo T.G., Pendergast A.M., Muller A.J., Witte O.N. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products // *Science.* – 1990. – 247. – P. 1079–82.
31. Melo J.V. The diversity of the BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype // *Blood.* – 1996. – 88. – P. 2375–84.
32. Passegué E., Jamieson C.H.M., Ailles L.E., Weissman I.L. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2003. – 100. – P. 11842–9.
33. Primo D., Flores J., Quijano S. et al. Impact of BCR/ABL gene expression on the proliferative rate of different subpopulations of haematopoietic cells in chronic myeloid leukaemia // *Brit. J. Haematol.* – 2006. – 135. – P. 43–51.
34. Satler M., Mohi M.G., Pride Y.B. et al. Critical role for Gab2 in transformation by bcr/abl // *Cancer cell.* – 2002. – 1. – P. 479–92.
35. Selleri C., Maciejewski J.P., Pane F. et al. Fas-mediated modulation of bcr/abl in CML results in differential effects on apoptosis // *Blood.* – 1998. – 92. – P. 981–9.
36. Sherbenou D.W., Hantschel O., Turaga L. et al. Characterization of bcr-abl deletion mutants CML patients // *Leukemia.* – 2008. – 22. – P. 1184–90.
37. Sillaber C., Gesbert F., Frank D.A. et al. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells // *Blood.* – 2000. – 95. – P. 2118–25.
38. Skipper H.E., Perry S. Kinetics of normal leukemic leukocyte population and relevance to chemotherapy // *Cancer Res.* – 1970. – 30. – P. 1883–97.
39. Stoklosa T., Poplawski T., Koptyra M. et al. Bcr/abl inhibits mismatch repair to protect from apoptosis and induce point mutations // *Cancer Res.* – 2008. – 68. – P. 2576–80.
40. Strife A., Lambek C., Wisniewski et al. Discordant maturation as the primary biological defect in CML // *Cancer Res.* – 1988. – 48. – P. 1035–41.
41. Traycoff C.V., Haistead B., Rice S. et al. Chronic myelogenous leukaemia CD34⁺ cells exit G0/G1 phases of cell cycle more rapidly than normal marrow CD34⁺ cells // *Brit. J. Haematology.* – 1998. – 102. – P. 759–67.

Издание 2-е, переработанное и дополненное

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ



Готовится к печати
Издательская группа РОНЦ

УДК 616-006:576.5.085:615.324:59

Л.М. Михайлова, И.Б. Меркулова, Н.П. Ермакова, А.И. Мишин, Н.Ю. Кульбачевская, В.М. Бухман**МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ
К ИССЛЕДОВАНИЮ ТУМОРОГЕННОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ
И БИОПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ
ПРИ ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ БЕЗОПАСНОСТИ**

РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация:*Меркулова Ирина Борисовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологии и токсикологии НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей***адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.:** +7(495)324-18-19**e-mail:** merkulovairina@rambler.ru

Статья поступила: 26.06.2010, принята к печати 01.04.2010.

Резюме

В связи с внедрением в клиническую практику методов клеточной терапии, основанных на трансплантации культивируемых клеток и биопрепаратов на их основе, имеется риск развития опухолей у реципиентов. Это связано с возможной трансформацией нормальных клеток в опухолевые в культуре, а также реактивацией опухолевых клеток, вводимых в организм пациента в составе цельноклеточной противоопухолевой вакцины. Поэтому тестирование туморогенности – необходимый этап доклинического исследования безопасности применения клеточных линий и клеточных биопрепаратов, предназначенных для трансплантации. В обзоре представлены используемые в настоящее время подходы, модели и методы исследования туморогенности *in vivo* и *in vitro*. Рассмотрены методы тестирования на животных (иммунодефицитные мыши линий Nude и SCID, бестимусные крысы, животные с искусственно созданной иммуносупрессией), модели на основе органных культур и критерии оценки туморогенности.

Ключевые слова: клеточные линии, биопрепараты, безопасность, туморогенность, иммунодефицитные животные, опухоль.

L.M. Mikhaylova, I.B. Merkulova, N.P. Ermakova, A.I. Mishin, N.Yu. Kulbachevskaya, V.M. Bukhman**METHODICAL APPROACHES
ON THE INVESTIGATION OF CELL LINES
AND CELLULAR BIOLOGICAL PRODUCTS TUMORIGENICITY
AT THEIR PRECLINICAL SAFETY ASSESSMENT**

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow

Abstract

The risk of tumor formation in recipients is rising with the development of the cellular therapy methods based on transplantation of cultivated cells and cell-based biological products. This is linked with possible malignant transformation of normal cells in culture as well as reactivation of tumor cells which are administered as a whole-cell anticancer vaccine. Therefore tumorigenicity testing is the necessary step for preclinical safety assessment of cell lines and cellular biologicals designed for transplantation. In this review we discuss currently used approaches, models and methods of research of tumorigenicity *in vitro* and *in vivo*. The testing methods on the animals (immunodeficient mouse strains Nude and SCID, athymic rats, animals with artificial immunosuppression), organ culture models, and tumorigenicity evaluation criteria are considered.

Key words: cell lines, biological products, safety, tumorigenicity, tumor, immunodeficient animals.

Введение

Внедрение клеточных технологий в клиническую практику ставит перед исследователями ряд вопросов, связанных с безопасностью применения клеточного материала с лечебной целью. В первую очередь это касается риска развития опухолей.

Феномен спонтанной опухолевой трансформации различных клеточных линий человека и животных в культуре выявлен давно и наблюдается довольно часто [4; 6; 9; 15; 19; 34]. Данное явление наблюдается, как правило, при длительном культивировании клеток и сопряжено с процессом клеточного старения. Основной причиной злокачественной трансформации, ассоциированной со старением, принято считать мутации, затрагивающие протоонкогены и гены-супрессоры опухолевого роста [14; 54]. Имеются также наблюдения аналогичного процесса при относи-

тельно коротких сроках культивирования и небольшим количестве пассажей. Так, у культивируемых мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга человека наблюдалась утрата контактного торможения роста уже на третьем пассаже, а появление первых хромосомных аномалий – на пятом [51]. Причины такой «ранней» трансформации пока не установлены. С развитием регенеративной медицины стали появляться сообщения о спонтанной злокачественной трансформации при длительном культивировании зрелых человеческих стволовых клеток [42]. Имеются наблюдения возникновения хромосомных aberrаций при длительном культивировании эмбриональных стволовых клеток человека [26; 33]. Показана способность трансформированных *in vitro* человеческих [42; 46; 51] и мышинных [49] МСК формировать злокачественные опухоли при введении экспериментальным животным.

Описанные случаи спонтанной опухолевой трансформации стволовых клеток могут служить косвенным подтверждением гипотезы развития рака из мутировавших нормальных стволовых и прогениторных клеток – «стволовых клеток опухоли» [22; 23].

Поскольку технология получения и наработки клеточного материала для клинического применения почти всегда связана с культивированием, все сказанное выше имеет прямое отношение к методам соматической клеточной и генной терапии. При этом следует также иметь в виду возможное негативное влияние на клетки некоторых манипуляций *ex vivo*, таких как направленная дифференцировка и трансфекция различными генами.

Кроме линий нормальных соматических клеток в качестве основы для производства клеточных биопрепаратов в последнее время стали использоваться опухолевые клеточные линии. Опухолевые линии, прежде всего – человеческие, могут использоваться для получения биопрепаратов для иммунотерапии опухолей под названием «терапевтические противоопухолевые вакцины» [5; 7; 8; 24; 27; 36; 37; 44]. Цельноклеточные противоопухолевые вакцины могут быть получены как из клеток определенной опухолевой линии, так и из аутологичного опухолевого материала. Генетически модифицированные противоопухолевые вакцины получают путем трансфекции опухолевых клеток генами различных цитокинов – ИЛ-2, ФНО, ГМ-КСФ и других. Поскольку эти клетки сами могут явиться источником нового опухолевого очага, перед введением пациенту производится их инактивация, чаще всего путем облучения. Так как радиочувствительность различных опухолевых штаммов варьирует в широких пределах и всегда есть вероятность восстановления пролиферативной активности облученных клеток, представляется необходимым исследовать их на способность к опухолевому росту *in vivo* при подборе дозы облучения. Для аллогенных вакцин это не менее актуально, чем для аутологичных, поскольку экспрессия трансплантационных антигенов клетками опухоли может быть низкой или отсутствовать.

Таким образом, реальную угрозу представляет собой риск возникновения новообразований у человека при применении клеточных линий и биопрепаратов на их основе. Поэтому оценка туморогенности должна быть включена в комплекс доклинических исследований клеточных линий и биопрепаратов для соматической клеточной терапии и тканевой инженерии.

Туморогенность

Согласно определению А.М. Lewis [32], туморогенность – это способность неопластических клеток, растущих в культуре, формировать опухоли при инокуляции животным. В более широком смысле под туморогенностью следует понимать способность злокачественно трансформированных (спонтанно или искусственно) клеток к пролиферации и формированию истинной опухоли в организме иммунологически толерантного реципиента. По отношению к реципиенту клетки могут быть аутогенными (в случае аутотрансплантации), аллогенными или ксеногенными. Туморогенность необходимо отличать от *онкогенности*, под которой подразумевается способность инокулируемых клеток или другого ДНК-содержащего материала вызывать опухолевую трансформацию клеток реципиента вследствие переноса онкогенов.

В нашей стране пока отсутствуют единые методические требования к доклиническому исследованию туморогенности клеточных линий и биопрепаратов на их основе, хотя необходимость таких требований не вызывает сомнений. В отечественной практике тест на формирование опухолей *in vivo* иногда проводится в рамках исследований канцерогенности – для оценки трансформирующего воздействия вещества на клеточные линии грызунов (в качестве модели используются сингенные животные [1]). Также некоторые методы исследования туморогенности (онкогенных потенциалов) отражены в методических указаниях [18]. Однако они полностью не удовлетворяют современным задачам, так как ориентированы на исследование перевиваемых, заведомо туморогенных клеточных линий.

В основе представленных подходов к исследованию туморогенности лежит опыт экспериментальных исследований, проведенных в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, а также международные и отечественные рекомендации по доклиническому изучению клеточных линий и биопрепаратов [1; 8; 13; 18; 30; 32; 41].

Общие подходы к исследованию туморогенности

Тестирование туморогенности клеточных биопрепаратов должно быть неотъемлемым этапом исследования их безопасности, стандартизации и контроля качества. Это особенно важно в тех случаях, когда клетки, входящие в состав биопрепарата, подвергались генетической модификации и другим манипуляциям в культуре [30].

Если клетки, входящие в состав биопрепарата, не подвергались манипуляциям *ex vivo* либо подвергались им в минимальной степени, то исследование туморогенности можно считать необязательным. К таким биопрепаратам относятся, среди прочих, костный мозг и отдельные его фракции, не подвергавшиеся экспансии в культуре; гемопоэтические стволовые клетки периферической крови, ЛАК.

Для передачи клеточного материала на исследование туморогенности необходимы следующие сведения:

- 1) история клеточной линии, которая должна включать данные о доноре (для клеточных линий человека – медицинский анамнез донора), методы, применяемые для выделения ткани, используемые питательные среды, реактивы и антибиотики, а также число пассажей и удвоений клеточной популяции,
- 2) морфологическая характеристика клеточной линии и данные цитогенетического исследования,
- 3) используемая система банка хранения клеточной линии,
- 4) подтверждение об отсутствии контаминации клеточной линии бактериями, грибами, вирусами (для человеческих линий – ВИЧ, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирусы гепатитов В и С), микоплазмой,
- 5) для генетически модифицированных клеток – используемый вектор, метод трансфекции, стабильность трансфекции и процент трансфицированных клеток,
- 6) доза ионизирующей радиации, применявшаяся для инактивации опухолевых клеток (для противоопухолевых цельноклеточных вакцин).

При тестировании туморогенности клеточных линий и биопрепаратов для клеточной и генной терапии на животных необходимо учитывать:

- чувствительность модели; данные о прививаемости конкретных опухолей на определенной линии животных и при определенных условиях,
- число вводимых клеток (ТПД – туморогенная прививочная доза),
- известный латентный период роста контрольной опухолевой клеточной линии,
- доступность животных и наличие необходимых условий для проведения исследования.

Исследование туморогенности *in vivo*

Виды животных и методы исследования

Выбор животного определяется видовой принадлежностью клеточного материала. Для исследования туморогенности клеточных линий и биопрепаратов, полученных на их основе от грызунов, можно использовать здоровых сингенных животных. Для исследования всех остальных, в том числе – человеческих клеточных линий рекомендуется использовать иммунодефицитных животных. Наиболее предпочтительными моделями являются стандартные сертифицированные животные с генетически обусловленным иммунодефицитом:

1. Бестимусные мыши (голые мыши, Nude). Эти животные являются носителями аутосомно-рецессивной мутации, которая в гомозиготном состоянии приводит к отсутствию внутриутробной закладки тимуса и волосяных луковиц, в результате чего они дефицитны по Т-лимфоцитам и лишены шерстного покрова. Используются как новорожденные, так и взрослые гомозиготные особи (Nu/Nu) [28; 29; 31; 32; 41]. В РОНЦ им. Н.Н. Блохина с 1976 г. используются бестимусные мыши линии Balb/c-nude собственного разведения с целью исследования трансплантации и получения штаммов и линий опухолей человека для противоопухолевой терапии, изучается эффективность новых противоопухолевых препаратов и противоопухолевых воздействий на моделях опухолей человека [2; 3; 10–12; 17]. Проведены успешные исследования туморогенности на мышках этой линии [8; 16].
2. Бестимусные крысы (Nude rats) – крысы с идентичной генетической аномалией [32];
3. Мыши с тяжелым комбинированным иммунодефицитом – SCID (Severe Combined Immune Deficiency). Это заболевание также наследуется по аутосомно-рецессивному типу и выражается в нарушении дифференцировки и созревания лимфоцитов, приводящему к несостоятельности гуморального и клеточного звеньев иммунитета. Результаты исследований последних лет продемонстрировали высокую прививаемость ксенотрансплантатов и опухолей на мышках линии SCID [13; 21; 38; 43; 45; 46; 51; 53].

Кроме стандартных линий животных с наследственным иммунодефицитом, в качестве моделей для изучения туморогенности давно используются животные с искусственно созданной иммуносупрессией. Такими моделями являются новорожденные и взрослые мыши, крысы или хомячки, обработанные АЛС или АТГ [39–41; 47; 50]. АЛС получают путем иммунизации кроликов суспензией клеток тимуса того вида

животных, на котором планируется проводить исследование – мыши, крысы или хомячка [40; 47; 50].

При исследовании туморогенности на новорожденных животных не позднее, чем через 24 ч после рождения, производят инокуляцию тестируемых клеток и в тот же день вводят подкожно 0,1 мл АЛС. Далее АЛС вводят в той же дозе на 2; 7 и 14 дни после рождения животного. Подход, основанный на применении антилимфоцитарной сыворотки у взрослых мышей, предусматривает введение АЛС в дозе 0,25 мл на животное в день введения исследуемых клеток, затем в 1; 3 дни и далее 2 раза в неделю до окончания эксперимента [47]. Применение АЛС позволяет добиться глубокой иммуносупрессии, достаточной для развития опухолей из ксеногенного материала. Однако в случае отсутствия стандартных коммерческих АЛС и АТГ исследования становятся трудоемкими и страдает воспроизводимость результатов.

Нельзя не упомянуть такой метод иммуносупрессии, как тимэктомия в сочетании с ТОТ и ТКМ от здорового сингенного донора, который широко использовался ранее [47]. Однако этот метод очень трудоемок и сопровождается значительной гибелью животных, поэтому в настоящее время он неактуален.

Условия постановки опыта

Для исследования туморогенности клеточных линий и клеточных биопрепаратов рекомендуется использовать по 10 животных в основной и контрольной группах [32; 41].

Известно, что при трансплантации бестимусным мышам опухолевых клеток из культуры подкожные опухоли возникают чаще и быстрее, чем при перевивке клеточной взвеси из операционного материала [31], поэтому оптимальным является использование культуры клеток.

При использовании любой тест-системы число исследуемых и контрольных клеток должно быть равным той дозе опухолевых клеток, при которой наблюдается прогрессивный рост опухолей не менее чем у 90 % животных. Согласно международным рекомендациям, эта доза составляет 1×10^7 клеток на животное [32; 41]. Клетки в указанной дозе не более чем за 2 ч до введения должны быть суспендированы в 0,2 мл питательной среды без сыворотки.

Рекомендуется подкожное введение, так как при этом достигаются оптимальные условия для регистрации размеров и определения границ опухоли. При п/к введении клеточного материала наиболее предпочтительной анатомической областью, на наш взгляд, является боковая поверхность туловища по средней или задней аксиллярной линии, ближе к подмышечной впадине. Следует избегать введения клеточной суспензии под кожу спины или в подмышечную впадину. В первом случае может наблюдаться замедленный рост опухоли из-за худшего кровоснабжения, в последнем опухоль труднее поддается измерению и часто инфильтрирует прилежащие лимфатические узлы, что затрудняет оценку характера метастазирования.

В качестве позитивного контроля используется суспензия клеток опухолевой линии одинаковой видовой принадлежности с тестируемой клеточной линией, которая вводится животным в той же дозе и тем же путем. Опухолевая клеточная линия должна быть высокотуморогенной, т. е. вызывать прогрессивный рост опухолей у 90–100 % животных при введении в дозе 1×10^7 клеток на животное. При выборе позитивного контроля следует соблюдать принцип гистогенетического сходства между контрольной линией и исследуемыми клетками.

Длительность наблюдения при исследовании туморогенности составляет 12 нед с момента инокуляции клеточного материала [32; 41]. Срок наблюдения, равный 21 дню [18], недостаточен для оценки туморогенности, поскольку латентный период образования опухолей для многих клеточных линий может быть более продолжительным. Так, например, для некоторых человеческих опухолевых линий (фибросаркома, липосаркома, хондросаркома, РМЖ) латентный период опухолевого роста на бестимусных мышцах составляет 22–38 дней [29], а отдельные линии трансформированных мышечных фибробластов при сингенной трансплантации могут иметь латентный период до 3–5 месяцев [19].

При исследовании туморогенности животных регулярно осматривают и пальпируют место введения клеточного материала с периодичностью, необходимой для регистрации роста опухоли: в первые 3 нед. от начала опыта – 1 раз в 3 дня, далее 1 раз в нед. В случае гибели животного следует в максимально короткий срок во избежание аутолиза произвести вскрытие и забор органов и тканей с места инокуляции клеток для патоморфологического исследования. В случае выраженного ухудшения состояния животного с высокой вероятностью смертельного исхода, оно подвергается внеплановому умерщвлению и патоморфологическому исследованию. Животные, у которых наблюдается регрессия новообразований, должны быть умерщвлены до того момента, когда новообразование перестанет определяться пальпаторно. Сформировавшиеся опухоли (узелки) измеряют в 3 плоскостях для определения объема. Всех животных с прогрессивно увеличивающимися узлами в контрольной и основной группах следует наблюдать в течение 2–3 нед., после чего животных выводят из опыта. Для основной группы рекомендуется двухэтапное выведение из опыта: половина животных без признаков опухолевого роста наблюдается в течение 3 нед, другая половина – в течение 12 нед [32; 41]. Умерщвление – ингаляции CO₂ или диэтилового эфира.

Патоморфологическое исследование

Все животные подвергаются аутопсии и тщательному макроскопическому исследованию внутренних органов и места инокуляции клеток или биопрепарата. Для гистологического исследования опухоли, возникшие на месте инокуляции клеток или биопрепарата, вырезают в пределах окружающих нормальных тканей. При отсутствии опухолевого узла вырезают участки кожи с подлежащими тканями (подкожная клетчатка, фасция, мышечная ткань), а также регионарные лимфатические узлы, селезенку, печень, почки, легкие, головной мозг и все макроскопически измененные ткани. Для обнаружения метастазов во внутренних органах делают послойные разрезы бритвой. Участки органов и тканей фиксируют в 10 %-ном нейтральном формалине и подвергают общепринятой гистологической обработке с обезвоживанием в спиртах, хлороформе, с заливкой в парафин, окраской срезов толщиной 5 мкм гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону.

При необходимости для верификации опухолевых и неопухолевых поражений могут быть применены и другие методики окраски гистологических срезов, ИГХ.

Критерии оценки

Туморогенность:

- 1) частота развития опухолей – отношение числа животных с развившимися опухолями к общему числу животных [32];

- 2) латентный период роста опухоли – время от момента инокуляции клеток до момента появления макроскопически определяемой опухоли (дни, недели) [32];
- 3) V и m опухолевого узла; n узлов [32];
- 4) наличие метастазов, подтвержденных гистологическим исследованием;
- 5) гистологическая структура опухолевого узла в зоне инокуляции клеток (при наличии), признаки инвазивного роста.

Результаты исследования считают достоверными, если наблюдается прогрессивный рост опухоли не менее чем у 9 из 10 животных контрольной группы [32].

Дополнительные методы исследования туморогенности (тест-системы *in vitro*)

В дополнение к тест-системам *in vivo* для исследования туморогенного потенциала клеточных линий были предложены тест-системы *in vitro*, основанные на характерных особенностях роста и миграции злокачественно трансформированных клеток в культуре.

В частности, было установлено, что отсутствие контактного торможения роста [20; 52] и способность клеток к делению в неприкрепленном состоянии [25; 28] коррелируют с их способностью к опухолевому росту при инокуляции животным. Вместе с тем, как было показано позднее, такая корреляция не является универсальной для всех клеточных линий [48]. Поэтому на основании только анализа культуральных характеристик клеток невозможно делать однозначных выводов об их туморогенности.

Еще одним отличительным признаком неопластических клеток является способность к инвазивному росту, которая легко воспроизводится в органных культурах. На этом основаны методы исследования туморогенности с применением культур различных тканей и органов, как моделей, имитирующих опухолевый рост *in vivo*.

Чаще всего используется кожа куриного эмбриона как наиболее чувствительный, недорогой и достаточно быстрый метод исследования туморогенности *in vitro* [35].

Фрагмент ткани получают иссечением кожи дорсальной поверхности 9-дневного куриного эмбриона и помещают эпидермальной поверхностью вниз на модифицированный агар Вольфа, состоящий из 10 частей 1 %-ного агара (Васто-агар) в сбалансированном солевом растворе Эрла без гидрокарбоната натрия, 4 частей фетальной телячьей сыворотки и 4 частей куриного эмбрионального экстракта. Эмбриональный экстракт получают путем измельчения куриного эмбриона и инкубацией полученного материала в сбалансированном солевом растворе Эрла без гидрокарбоната натрия при +4 °C в течение 12 ч с последующей очисткой центрифугированием в течение 10 мин при 2000 g.

Тестируемые в опыте клетки в количестве 1×10^5 суспендируют в 0,025 мл среды MEM и наносят на свободную (дермальную) поверхность кожного фрагмента, после чего органный культуру инкубируют в течение 3 суток при + 37 °C и повышенной влажности.

Затем ткань фиксируют и проводят стандартное гистологическое исследование с окраской срезов гематоксилином и эозином. Данный метод с незначительными изменениями применяется в отечественной практике [18].

В качестве другой модели рекомендуется использовать культуру мышечной ткани человека [39]. Для ее приготовления используются образцы здоровой жизнеспособной мышечной ткани, полученные в ходе хирургических вмешательств, выполненных по медицинским показаниям у пациентов, не страдающих онкологическими заболеваниями. Ткань измельчается на фрагменты размерами 2×2×3 мм, которые до начала исследования хранят в культуральной среде МАВ 87/3 с гентамицином 0,05 мг/мл, содержащей 10% ФТС, при +4 °С. Изготавливаются агаровые блоки диаметром 15 мм и высотой 6 мм, с центральными лунками диаметром 4 мм и глубиной 3 мм. Фрагменты мышечной ткани помещаются на дно лунок в агаровых блоках, которые предварительно были помещены в центр культуральных чашек диаметром 35 мм и глубиной 15 мм. Исследуемые клетки в количестве от 1×10^5 до 5×10^5 суспендируют в 0,02 мл среды МАВ 87/3 и наносят на свободную поверхность мышечной ткани. Около 4 мл той же среды наливают в культуральную чашку, так чтобы она омывала агаровый блок. Материал инкубируют в течение 7 дней при 37 °С в увлажненной атмосфере, состоящей из 96 % воздуха и 4 % CO₂, после чего ткань фиксируют и проводят стандартное гистологическое исследование с окраской гематоксилином и эозином. Критерием туморогенности в последних двух тест-системах является наличие инвазии исследуемых клеток в подлежащую ткань.

Несмотря на простоту и доступность, тест-системы *in vitro* пока не могут служить альтернативой исследованиям *in vivo*, так как не воспроизводят всех условий, необходимых для развития опухоли. Они могут применяться в качестве дополнительных методов, в том числе при оценке динамики трансформации длительно культивируемых линий, не обладающих туморогенностью на ранних пассажах [41].

Литература

1. Белицкий Г.А., Ревазова Ю.А., Абелев С.К. и др. Руководство по экспериментальному доклиническому изучению новых фармакологических веществ. Методические указания по оценке канцерогенности фармакологических средств и вспомогательных веществ в краткосрочных тестах. – М., 2005. – С. 131–70.
2. Бухарова И.К., Ревазова Е.С., Мороз Л.В. Эффективность некоторых новых противоопухолевых препаратов на моделях опухолей человека // Вестн. Всесоюз. Онкол. Научн. Центра АМН СССР. – 1990. – № 1. – С. 8–11.
3. Бухарова И.К., Ревазова Е.С., Мороз Л.В. Чувствительность к противоопухолевым препаратам штаммов опухолей у иммунодефицитных мышей // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 1994. – Т. 118; № 9. – С. 298–99.
4. Гувакова М.А. Особенности изменения ростовых свойств клеток в процессе их спонтанной неопластической трансформации: Дис. ... канд. биол. наук. СО РАН. Ин-т цитологии и генетики. – Новосибирск, 1992. – 16 с.
5. Коростелев С.А. Противоопухолевые вакцины // Совр. Онкол. – 2003. – № 4. – С. 15–9.
6. Кузьмина С.В., Куликова К.С. Цитологическая и цитохимическая характеристика эмбриональных мышечных фибробластов в условиях длительного культивирования, приводящего к малигнизации // Проблема профилактики кори и противовирусные препараты. Материалы VII научной конференции 8–10 июня 1966 г. – М., 1966. – С. 157–9.
7. 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.
8. Михайлова Л.М., Ермакова Н.П., Меркулова И.Б. и др. Исследование туморогенности противоопухолевой вакцины «Мелавак» // Тез. докл. III съезда токсикологов России, 2–5 декабря 2008 г. – М., 2008. – С. 514–5.
9. Пан Е. Изменение штаммов нормальных эмбриональных клеток человека после длительного культивирования и сравнение их со штаммами опухолевых клеток // Тез. докл. VIII международного противоракового конгресса. – М., 1962. – С. 122.
10. Ревазова Е.С. Рост опухолей человека у бестимусных мышей, получение штаммов опухолей человека, их характеристика и использование в химиотерапии: Дис. ... д-ра мед. наук. – М., 1981.
11. Ревазова Е.С., Брызгалов И., Сорокина Ю., Иванов А.И. др. Низкосиловое лазерное облучение, стимулирующее рост человеческой опухоли // Бюл. экспер. биол. и мед. – 2001. – Т. 132; № 8. – С. 195–6.
12. Ревазова Е.С., Соловьев Ю.Н., Пучкова Г.П., Юдичева Т.В. Трансплантация опухолей человека бестимусным мышам // Вестн. АМН СССР. – 1978. – С. 42–6.
13. Ржанинова А.А., Ермакова Н.П., Меркулова И.Б. и др. Исследование туморогенности культивированных хондробластов человека // Тез. докл. III съезда токсикологов России, 2–5 декабря 2008 г. – М., 2008. – С. 238–9.
14. Романчиков Ю.М. Старение и иммортализация клеток животных: ключевая роль ядерных протоонкогенов // Изв. Рос. АН. Сер. биол. – 1992. – № 4. – С. 643–5.

Заключение

Оценка туморогенности является необходимым этапом доклинического исследования безопасности, стандартизации и контроля качества клеточных биопрепаратов.

Существует ряд методов исследования туморогенности *in vivo* и *in vitro*, однако наиболее простыми и объективными следует считать методы с использованием иммунодефицитных животных – мышей линий Nude и SCID, а также бестимусных крыс. Использование иммунодефицитных животных позволяет тестировать на туморогенность любые по отношению к реципиенту клеточные линии – аутологичные, аллогенные и ксеногенные, а также биопрепараты на их основе, что крайне важно для оценки их безопасности для человека.

Тестирование туморогенности включает ряд простых методических подходов, касающихся количественного состава групп животных, дозы вводимых клеток, сроков наблюдения, стандартных процедур инокуляции клеток, измерения опухоли и патоморфологического исследования.

Критерии оценки туморогенности *in vivo* включают: частоту развития опухолей, латентный период роста опухоли, объем, массу и число опухолевых очагов; гистологическую структуру опухолевого узла или ткани в месте инокуляции клеточного материала; наличие инвазивного роста и метастазов.

Методы, предусматривающие использование животных с искусственно созданной иммуносупрессией, как правило, более трудоемки и могут давать высокий процент гибели животных. Методы исследования туморогенности на органных культурах *in vitro* могут быть использованы лишь как дополнение к методу *in vivo* или как предварительные – для ориентировки в отношении туморогенности.

15. Тимофеевский А.Д. Культура тканей вне организма и проблема опухолей // Природа. – 1956. – №6. – С. 13–22.
16. Трещалина Е.М., Андропова Н.Т., Райхлин Н.Т. Изучение онкогенных потенций различных иммунобиологических препаратов на иммунодефицитных мышах // РБЖ. – 2009. – №1. – С. 38–9.
17. Хохлов А.П., Трещалина Е.М., Доценко А.Н. и др. Действие нового производного сквалена Севит-Ф на опухоли человека у мышей Nude // РБЖ. – 2004. – №1. – С. 22–3.
18. Шалунова Н.В., Ломанова Г.А. Аттестация перевиваемых клеточных линий – субстратов производства и контроля медицинских иммунобиологических препаратов. Методические указания. / ГНИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича. – М., 1989.
19. Юрченко Ю.А. Закономерности спонтанной опухолевой трансформации фибробластов мышей и крыс: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. АН СССР. Сиб. отд-ние. Ин-т цитологии и генетики. – Новосибирск, 1988. – 16 с.
20. Aaronson S.A., Todaro G.J. Basis for the Acquisition of Malignant Potential by Mouse Cells Cultivated *in vitro* // Science. – 1968. – 162. – P. 1024–6.
21. Bensidhoum M., Chapel A., Francois S. et al. Homing of *in vitro* expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment // Blood. – 2004. – 103. – P. 3313–9.
22. Clarke M., Dick J., Dirks P. et al. Cancer Stem Cells – Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells // Cancer Res. – 2006. – 66. – P. 9339–44.
23. Dalerba P., Cho R.W., Clarke M.F. Cancer Stem Cells: Model and Concepts // Annu. Rev. Med. – 2007. – 58. – P. 267–84.
24. Davis I.D., Jefford M., et al. Rational approaches to human cancer immunotherapy // Leukoc. Biol. – 2003. – 73. – P. 3–29.
25. DiMayorca G., Greenblatt M., Trauthen T. et al. Malignant transformation of BHK21 clone 13 cells *in vitro* by nitrosamines – a conditional state // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1973. – 70. – P. 46–9.
26. Draper J.S., Smith K., Gokhale P. et al. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells // Nat. Biotechnol. – 2004. – 22. – P. 53–4.
27. Espinoza-Delgado I. Cancer Vaccines // The Oncologist. – 2002. – 7. – P. 20–33.
28. Freedman V.H., Shin S. Cellular tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi-solid medium // Cell. – 1974. – 3. – P. 355–9.
29. Giovanella B.C., Stehlin J.S. Jr, Williams L.J. et al. Heterotransplantation of human cancers into nude mice: a model system for human cancer chemotherapy // Cancer. – 1978. – 42. – P. 2269–81.
30. Guidelines for the clinical translation of stem cells / International Society for Stem Cell Research. – 2008. – <http://www.isscr.org>
31. Hajdu S., Fogh J. The nude mouse as a diagnostic tool in human tumor cell research. In: Fogh J., Giovanella B. C. eds. The nude mouse in experimental and clinical research. – New York: Academic Press, 1978. – P. 502–4.
32. Lewis A.M. Jr. Regulatory implications of neoplastic cell substrate tumorigenicity / U. S. Food and Drug Administration. – 2005. – 31 p.
33. Maitra A., Arking D.E., Shivapurkar N. et al. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells // Nature Genetics. – 2005. – 37. – P. 1099–103.
34. Moore A.E. Tumor formation by cultured cells derived from normal and cancerous tissues // Special Publ. New York Acad. Sci. – 1957. – 5. – P. 321–9.
35. Noguchi P.D., Johnson J.B., O'Donnell R., Petricciani J.C. Chick embryonic skin as a rapid organ culture assay for cellular neoplasia // Science. – 1978. – 199. – P. 980–3.
36. Ostrand-Rosenberg S. Tumor immunotherapy: the tumor cell as an antigen-presenting cell // Curr. Opin. Immun. – 1994. – 6. – P. 722–7.
37. Ostrand-Rosenberg S., Pulaski B.A., Clements V.K. et al. Cell-based vaccines for the stimulation of immunity to metastatic cancer // Immunol. Rev. – 1999. – 170. – P. 101–14.
38. Petricciani J.C., Levenbook I., Locke R. Human muscle: a model for the study of human neoplasia // Invest. New Drugs. – 1983. – 1. – P. 297–302.
39. Philips B., Gazet J.C. Effect of antilymphocyte serum on the growth of Hep 2 and HeLa cells in mice // Nature. – 1968. – 220. – P. 1140–1.
40. Points to consider in the characterization of cell lines used to produce biologicals / U. S. Food and Drug Administration. – 1993. – 40 p.
41. Rubio D., Garcia-Castro J., Martin M.C. et al. Spontaneous human adult stem cell transformation // Cancer Res. – 2005. – 65. – P. 3035–9.
42. Schumacher U., Adam E. Immunohistochemical detection of the MUC1 gene product in human cancers grown in scid mice // J Histochem Cytochem. – 1998. – 46. – P. 127–34.
43. Schadendorf D., Belardelli F., et al. Conference on cancer vaccines // Cancer Immunol. Immunother. – 2000. – 49. – P. 281–4.
44. Schumacher U., Mitchell B.S. Use of clinically relevant human-scid-mouse models in metastasis research // Trends Biotechnol. – 1997. – 15. – P. 239–41.
45. Serakinci N., Guldberg P., Burns J. et al. Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation // Oncogene. – 2004. – 23. – P. 5095–8.
46. Stanbridge E.J., Boulger L.R., Franks C.R. et al. Optimal conditions for the growth of malignant human and animal cell populations in immunosuppressed mice // Cancer Res. – 1975. – 35. – P. 2203–12.
47. Stiles C.D., Desmond W., Chuman L.M. et al. Relationship of cell growth behavior *in vitro* to tumorigenicity in athymic nude mice // Cancer Res. – 1976. – 36. – P. 3300–5.
48. Tolar J., Nauta A.J., et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells // Stem Cells. – 2007. – 25. – P. 371–9.
49. Wallace R., Vasington P.J., Petricciani J.C. Heterotransplantation of cultured cell lines in newborn hamsters treated with antilymphocyte serum // Nature. – 1971. – 230. – P. 454–5.
50. Wang Y., Huso D.L., Harrington J. et al. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture // Cytotherapy. – 2005. – 7. – P. 509–19.
51. Weiss R.A., Vesely P., Sinderlarova J. Growth regulation and tumour formation of normal and neoplastic rat cells // Cancer. – 1973. – 11. – P. 77–89.
52. Xiao-Nan L., Qin S., et al. Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC // Mol. Canc. Ther. – 2005. – 4. – P. 1912–22.
53. Yeager T.R., et al. Overcoming cellular senescence in human cancer pathogenesis // Genes & Dev. – 1998. – 12. – P. 163–74.

УДК 615.277.3.099:557.114

Е.А. Сафонова, К.А. Лопатина, Т.Г. Разина, Е.П. Федорова, А.В. Пахомова, А.В. Вычужанина,
Е.П. Зуева, Л.А. Ефимова

**КОРРЕКЦИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ПАКЛИТАКСЕЛА
НА СИСТЕМУ КРОВИ И ЭПИТЕЛИЙ ТОНКОЙ КИШКИ
ВОДОРАСТВОРИМЫМИ ПОЛИСАХАРИДАМИ МАТЬ-И-МАЧЕХИ ОБЫКНОВЕННОЙ,
АИРА БОЛОТНОГО И ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ
НИИ фармакологии СО РАМН**

Контактная информация:

Сафонова Елена Андреевна, аспирант лаборатории онкофармакологии НИИ фармакологии СО РАМН
адрес: 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3; тел.: +7(3822)41-83-78
e-mail: zer0929@mail.ru

Статья поступила: 01.10.2009, принята к печати 01.04.2010.

Резюме

В эксперименте на мышах с LLC исследована способность ВРПС мать-и-мачехи обыкновенной, аира болотного и эхинацеи пурпурной повышать эффективность противоопухолевой терапии. Водорастворимые полисахариды уменьшают токсическое действие паклитаксела на систему крови и эпителий тонкой кишки, а также повышают противометастатическое действие цитостатика.

Ключевые слова: полисахариды, паклитаксел, система крови, тонкая кишка.

*E.A. Safonova, K.A. Lopatina, T.G. Razina, E.P. Fedorova, A.V. Pahomova, A.V. Vychuzhanina,
E.P. Zueva, L.A. Efimova*

**CORRECTION PACLITAXEL TOXIC EFFECT
ON BLOOD SYSTEM AND EPITHELIUM OF INTESTINE
BY WATER-SOLUBLE POLYSACCHARIDES FROM TUSSILAGO FARFARA,
ACORUS CALAMUS AND ECHINACEA PURPUREA
Institute of Pharmacology of Siberian Branch RAMS, Tomsk**

Abstract

Water-soluble polysaccharides from *Tussilago farfara*, *Acorus calamus* and *Echinacea Purpurea* enhance the antimetastatic efficiency of paclitaxel in mice with lung Lewis carcinoma. Water-soluble polysaccharides reduce paclitaxel toxic action on blood system and epithelium of intestinal.

Key words: polysaccharides, paclitaxel, blood system, intestine.

Введение

ХТ – один из основных методов лечения распространенных злокачественных новообразований. Но цитостатики не обладают опухолевой специфичностью, повреждая также здоровые органы и ткани. Наиболее часто встречается гематологическая (85–90 %) и гастроинтестинальная (до 90 %) токсичность [9]. Паклитаксел – современный антибластомный препарат для лечения злокачественных опухолей, однако наряду с высокой эффективностью он проявляет высокую токсичность [5; 6]. В связи с этим актуальна разработка методов фармакологической коррекции эффективности ХТ и снижения побочного действия противоопухолевых препаратов.

Перспективны для создания такого рода средств полисахариды растительного происхождения, которые стимулируют иммунную систему, обладают гиполипидемическим, противовоспалительным, противопухолевым действием. Установлен факт активации процессов кроветворения некоторыми полисахаридами: при введении в организм растительные полисахариды стимулируют обмен веществ, способствуя процессам регенерации и роста, усилению пролиферации наиболее быстро делящихся клеток [7; 11; 12].

Ранее было показано повышение противоопухолевого эффекта при совместном использовании ЦФ и ВРПС мать-и-мачехи обыкновенной, аира болотного и эхинацеи пурпурной [4]. **Цель исследования** – изу-

чение влияния ВРПС мать-и-мачехи обыкновенной, аира болотного и эхинацеи пурпурной на систему крови и эпителий тонкого кишечника, а также на рост и метастазирование LLC на фоне терапии паклитакселом.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на мышах-самках линии С57В1/6 массой 19–20 г. Животные 1 категории разведения лаборатории экспериментального биомоделирования НИИ фармакологии СО РАМН содержались в соответствии с «Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей» (Страсбург, 1986). Использование животных в эксперименте было осуществлено в соответствии с нормами локального независимого этического комитета НИИ фармакологии СО РАМН (протокол № 8/09 от 22-10-2009). До и в период эксперимента мыши находились в виварии при температуре воздуха +20–22 °С, влажности – не более 50 %, объеме воздухообмена (вытяжка: приток) – 8:10, в световом режиме – день–ночь, в стандартных пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой и получали стандартный рацион (гранулированный корм ПК120-3 согласно приказу №1179 МЗ СССР от 10.10.83).

Для исключения сезонных колебаний исследуемых показателей эксперименты проводились в осенне-зимний период.

Таблица 1

Изменение клеточного состава лейкоцитарной формулы у мышей-самок линии С57В1/6 с LLC под влиянием ВРПС мать-и-мачехи обыкновенной, айра болотного и эхинаеи пурпурной на фоне терапии паклитакселом ($X \pm m$), г/л

Группа наблюдения	Количество лейкоцитов	Нейтрофилы		Лимфоциты	Моноциты	Эозинофилы
		Палочкоядерные				
		Палочкоядерные	Сегменто-ядерные			
5 сут после введения паклитаксела						
1. Контроль	12,66±0,85	0,06±0,40	4,38±0,24	6,46±0,87	1,66±0,22	0,10±0,04
2. Паклитаксел	12,58±0,32	0,10±0,45	0,82±0,10 1-2P<0,01	9,32±0,89	2,34±0,67	–
3. Паклитаксел + ВРПС мать-и-мачехи	13,74±0,57	–	0,72±0,16	11,80±0,60 2-3P<0,05	1,22±0,10	–
4. Паклитаксел + ВРПС айра	11,42±0,91	0,10±0,04	0,59±0,08	9,34±0,84	1,35±0,14	0,04±0,02
5. Паклитаксел + ВРПС эхинаеи	12,00±1,14	0,02±0,02	1,26±0,25	8,98±0,97	1,66±0,2	0,08±0,03
8 сут после введения паклитаксела						
1. Контроль	14,86±1,34	0,02±0,02	2,90±0,27	10,64±0,96	1,30±0,25	–
2. Паклитаксел	18,82±2,30	0,14±0,07	2,20±0,30 1-2P<0,05	13,54±1,72	2,88±0,67	0,06±0,04
3. Паклитаксел + ВРПС мать-и мачехи	22,46±1,22	0,13±0,05	5,90±0,37 2-3P<0,01	13,62±0,79	2,51±0,47	0,30±0,06 2-3P<0,01
4. Паклитаксел + ВРПС айра	19,78±2,90	0,12±0,08	6,04±0,62 2-4P<0,01	11,60±1,93	1,76±0,36	0,26±0,17
5. Паклитаксел + ВРПС эхинаеи	23,20±2,97	0,10±0,06	6,36±0,91 2-5P<0,01	14,34±1,64	2,18±0,64	0,22±0,13

Табл. 1–2 кровь на анализ брали у 5 животных в группе; табл. 1–4 перед уровнем значимости Р указаны номера сравниваемых групп.

Таблица 2

Изменение показателей красной крови у мышей-самок линии С57В1/6 с LLC под влиянием ВРПС мать-и-мачехи обыкновенной, айра болотного и эхинаеи пурпурной на фоне терапии паклитакселом ($X \pm m$)

Группа наблюдения	Гемоглобин, г/л	Количество эритроцитов, $10^{12}/л$	Гематокрит, %	Количество тромбоцитов, $10^9/л$					
					5 сут после введения паклитаксела				
					1. Контроль	145,2±14,21	8,32±0,78	33,90±3,28	3,59±0,52
2. Паклитаксел	113,4±4,04 1-2P<0,05	6,57±0,31 1-2P<0,05	27,34±1,49	6,21±0,34					
3. Паклитаксел + ВРПС мать-и-мачехи	149,0±11,96 2-3P<0,05	8,99±0,89 2-3P<0,05	36,64±3,65 2-3P<0,05	6,79±1,11					
4. Паклитаксел + ВРПС айра	145,2±11,47 2-4P<0,05	8,70±0,82 2-4P<0,05	35,16±3,27 2-4P<0,05	5,50±0,70					
5. Паклитаксел + ВРПС эхинаеи	135,25±12,78	8,23±0,82	33,23±3,33	5,04±0,69					
8 сут после введения паклитаксела									
1. Контроль	128,0±13,77	7,73±0,87	32,40±3,62	1,11±0,15					
2. Паклитаксел	163,2±15,20 1-2P<0,05	10,16±1,04 1-2P<0,05	43,36±4,52 1-2P<0,05	1,91±0,74					
3. Паклитаксел + ВРПС мать-и-мачехи	190,6±16,81	12,11±1,10	50,70±4,60	4,55±0,51 2-3P<0,05					
4. Паклитаксел + ВРПС айра	147,2±21,62	8,70±1,36	37,30±5,92	2,61±0,14					
5. Паклитаксел + ВРПС эхинаеи	150,2±13,13	8,74±0,69	37,14±3,50	2,98±0,58					

Таблица 3

Численность клеточных популяций эпителия тонкой кишки и митотический индекс у мышей с LLC при введении паклитаксела в сочетании с ВРПСaira болотного, мать-и-мачехи обыкновенной и эхинацеи пурпурной ($X \pm m$)

Группа наблюдения	Количество клеток в криптах	Количество клеток на ворсинках	Митотический индекс, %
1. Контроль	31,98±0,35	145,04±1,28	4,40±0,17
2. Паклитаксел	31,52±0,15	137,58±0,59 1-2P<0,01	1,65±0,14 1-2P<0,01
3. Паклитаксел + ВРПС мать-и-мачехи	34,10±0,13	127,46±0,96 2-3P<0,01	2,51±0,11 2-3P<0,01
4. Паклитаксел + ВРПС аира	34,72±0,38 2-4P<0,01	141,50±0,91 2-4P<0,01	3,51±0,09 2-4P<0,01
5. Паклитаксел + ВРПС эхинацеи	39,44±0,98 2-5P<0,01	123,04±0,79 2-5P<0,01	3,03±0,15 2-5P<0,01

Подсчет показателей производили у 5 животных в группе.

Таблица 4

Влияние ВРПС мать-и-мачехи обыкновенной, аира болотного, эхинацеи пурпурной на развитие LLC у мышей-самок линии С57В1/6 и эффективность лечения паклитакселом

Группа наблюдения, доза препарата (количество животных)	Масса опухоли ($X \pm m$), г	Торможение либо стимуляция (-) роста опухоли, %	Частота метастазирования	Количество метастазов на 1 мышшь ($X \pm m$)	Площадь метастазов на 1 мышшь ($X \pm m$), м ²	ИИМ, %
1. Контроль (9)	5,34±0,29	-	100	25,56±1,79	23,23±4,40	-
2. Паклитаксел 20 мг/кг □ 1 (10)	5,18±0,14	5	100	20,50±3,02	30,87±11,9	20
3. Паклитаксел 20 мг/кг □ 1 + ВРПС мать-и-мачехи 10 мг/кг □ 12 (10)	5,01±0,21	6	100	17,10±1,66 1-3P<0,01	17,20±3,30	33
4. Паклитаксел 20 мг/кг □ 1 + ВРПС эхинацеи 10 мг/кг x 12 (10)	5,69±0,23	-6	100	19,90±1,98 1-4P<0,01	23,60±4,20	22
5. Паклитаксел 20 мг/кг □ 1 + ВРПС аира 10 мг/кг □ 12 (9)	5,38±0,14	1	100	27,11±3,41	26,85±4,71	-6

LLC перевивали внутримышечно по 5–6 млн опухолевых клеток в 0,1 мл физиологического раствора. Для моделирования токсического действия на систему крови и эпителий тонкой кишки использовали паклитаксел («Тахол», «Доктор Редди'с Лабораторис Лтд», Индия, г. Хайдерабат). Цитостатик вводили внутрибрюшинно однократно в дозе 20 мг/кг на 10 сутки развития опухоли (день трансплантации считали 1 сут развития LLC).

ВРПС листьев мать-и-мачехи обыкновенной (*Tussilago farfara L.*), корневищ аира болотного (*Acorus calamus L.*) и цветков эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea M.*) получены из фармакопейного растительного сырья фракционным методом на кафедре химии ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (г. Томск). Начало лечения полисахаридами приходилось на 8 сут развития LLC. Полисахариды предварительно растворяли в дистиллированной воде и вводили животным внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг в течение 10 сут (с одним перерывом на 13 сут).

На 5 и 8 сут после введения паклитаксела (1 сут считали день введения цитостатика) определяли показатели периферической крови на гематологическом анализаторе «Abacus» («Diatron») в ветеринарном режиме.

Определяли концентрацию гемоглобина, количество эритроцитов, тромбоцитов, общее число лейкоцитов. Для подсчета лейкограммы проводили микроскопическое исследование цитологических препаратов, окрашенных азуром II-эозином.

На 19 сут развития опухоли (10 сут после введения паклитаксела) проводили морфологическое исследование эпителия верхней трети тонкого кишечника, для этого кусочек тонкой кишки фиксировали в жидкости Карнуа, заливали в парафин и готовили срезы толщиной 5 мкм.

Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилин-эозином по Карацци. На продольных срезах подсчитывали среднее количество эпителиальных клеток в криптах (не менее чем в 10). В этих же криптах подсчитывали количество митозов и вычисляли митотический индекс как процент клеток в митозе от общего количества просмотренных клеток. Количество клеток на ворсинках подсчитывали от основания до вершины, выбирая 10 ворсинок на каждом препарате [2].

Эксперимент заканчивали на 19 сут развития LLC, в это же время оценивали способность ВРПС влиять на противоопухолевую и антиметастатическую эффективность паклитаксела. В конце эксперимента определяли процент торможения роста опухоли, частоту метастазирования, количество и площадь метастазов в легких мышей. Различия метастазирования опухоли между контролем и опытом по индексу ингибирования метастазирования:

$$ИММ = \frac{((A_1 \times B_1) - (A_2 \times B_2))}{(A_1 \times B_1)} \times 100, \text{ где}$$

A_1 – частота метастазирования в контрольной группе;
 A_2 – частота метастазирования в опытной группе;
 B_1 – среднее количество метастазов у животных контрольной группы;
 B_2 – среднее количество метастазов у животных опытной группы [1].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью критерия Вилкоксона–Манна–Уитни и углового преобразования Фишера [3].

Результаты и обсуждение

При оценке действия цитостатика на систему периферической крови получены следующие результаты: на 5 и на 8 сут после однократного введения паклитаксела мышам с LLC наблюдалась выраженная нейтропения: количество сегментоядерных нейтрофилов было в 5,3 раза ($P < 0,01$) и в 1,3 раза ($P < 0,05$) меньше соответствующих контрольных значений. При анализе показателей красной крови выявлено, что на 5 сут после инъекции цитостатика количество эритроцитов и концентрация гемоглобина уменьшились в 1,3 раза ($P < 0,01$) относительно контроля, а к 8 сут эти данные оказались достоверно выше контрольного уровня (табл. 1; 2).

При добавлении в схему лечения паклитакселем ВРПС мать-и-мачехи обыкновенной на 5 сут после введения цитостатика число лимфоцитов оказалось выше в 1,3 раза ($P < 0,05$) по сравнению с этим значением у мышей, получавших только цитостатик. К 8 сут повысилось количество сегментоядерных нейтрофилов в 2,7 раза ($P < 0,01$) относительно такового у мышей, леченных паклитакселем. Анализ показателей красной крови выявил, что на 5 сут после введения паклитаксела концентрация гемоглобина и гематокрит были выше в 1,3 раза, количество эритроцитов – в 1,4 раза ($P < 0,05$); к 8 сут увеличение этих данных оказалось на уровне тенденции, в то же время достоверно возросло число тромбоцитов в 2,4 раза относительно такового у мышей, которым вводили один антибластомный препарат (*ibidem*).

На 5 сут после введения цитостатика у мышей, леченных паклитакселем и ВРПС аира болотного, количество нейтрофильных лейкоцитов не отличалось от такового у животных группы монохимиотерапии, в то время как к 8 сут был зафиксирован их достоверный прирост в 2,7 раза. Со стороны красной крови у мышей данной группы на 5 сут обнаружено, что показатели гемоглобина, гематокрита, количества эритроцитов превосходили в 1,3 раза ($P < 0,05$) эти значения у леченных только паклитакселем животных.

При совместном использовании паклитаксела и ВРПС эхинацеи пурпурной на 8 сут после инъекции паклитаксела зафиксировано увеличение количества сегментоядерных нейтрофилов в 2,9 раза ($P < 0,01$) относительно таковых у мышей группы монохимиотерапии; со стороны красной крови у животных этой группы достоверных изменений не отмечено (см. табл. 1–2).

На 10 сут после однократного введения паклитаксела в дозе 20 мг/кг мышам с LLC было выявлено его токсическое действие на слизистую оболочку тонкого кишечника: достоверно меньше оказалось количество эпителиальных клеток на ворсинках, митотический индекс снизился в 2,7 раза ($P < 0,01$), число энтероцитов в криптах оставалось на уровне контроля (табл. 3).

У мышей, получавших паклитаксел совместно с применением ВРПС аира болотного, достоверно больше оказалось количество эпителиальных клеток в криптах и на ворсинках, митотический индекс при этом был выше в 2,1 раза ($P < 0,01$) по сравнению с этими показателями у мышей, леченных только цитостатиком.

При использовании ВРПС эхинацеи пурпурной и мать-и-мачехи обыкновенной на фоне цитостатической терапии численность клеточных популяций ворсинок в этот срок наблюдения была ниже таковой у мышей группы монохимиотерапии.

В то же время, следует отметить, что комбинированное лечение паклитакселом и ВРПС эхинацеи привело к усилению репаративных процессов в криптах, о чем свидетельствовало увеличение количества клеток в криптах и митотического индекса (в 1,3 и 1,8 раза соответственно, $P < 0,01$) относительно этих показателей у мышей, получавших только цитостатик (табл. 3).

При добавлении в схему лечения паклитакселом ВРПС мать-и-мачехи зафиксировано достоверно меньшее количество клеток на ворсинках, однако митотический индекс был выше в 1,5 раза ($P < 0,01$) по сравнению с этими показателями у мышей группы монокимиотерапии. Кроме того, у животных в этой группе наблюдения отмечена тенденция к увеличению количества клеток в криптах (табл. 3).

Паклитаксел в используемой дозе не оказал достоверного влияния на развитие LLC, в то время как при совместном применении цитостатика и ВРПС мать-и-мачехи количество метастазов в легочной ткани уменьшилось в 1,5 раза ($P < 0,01$), а их площадь – в 1,4 раза по сравнению с контролем, индекс ингибирования метастазирования составил 33 % против 20 % в группе мышей, получавших паклитаксел. Сочетанное введение паклитаксела и ВРПС эхинацеи привело к снижению числа метастазов в 1,3 раза ($P < 0,01$) по сравнению с контролем. Добавление в схему лечения паклитакселом ВРПС айра не изменяло противоопухолевого и антиметастатического эффекта цитостатика (табл. 4).

Полученные результаты свидетельствуют о защитном влиянии ВРПС мать-и-мачехи обыкновенной, айра болотного и эхинацеи пурпурной на активно обновляющиеся ткани организма – систему крови и эпителий тонкой кишки, которые в наибольшей степени подвержены токсическому действию ХТ.

Выводы

Таким образом, введение в схему лечения паклитакселом ВРПС мать-и-мачехи обыкновенной, айра болотного и эхинацеи пурпурной приводит к уменьшению токсического влияния паклитаксела на систему крови и эпителий тонкого кишечника мышей с карциномой легких Льюис. Кроме того, при совместном использовании ВРПС мать-и-мачехи обыкновенной и эхинацеи пурпурной с паклитакселом снижается количество и площадь метастатического поражения легких животных с LLC.

Литература

1. *Архипов С.А., Юнкер В.М., Грунтенко Е.В.* Изменение интенсивности метастазирования в легкие перевиваемых опухолей мышей в зависимости от величины перевивочной дозы опухолевых клеток. – Исследование по индукции и метастазированию опухолей у экспериментальных животных. – Новосибирск, 1984. – С. 14–32.
2. *Зуфаров К.А., Байбеков И.М., Ходжиметов А.А.* Компенсаторно-приспособительные процессы в кишечнике. – М.: Медицина, 1974. – 208 с.
3. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. – М.: Высшая школа, 1980. – 293 с.
4. *Лопатина К.А., Гурьев А.М.* Влияние водорастворимых полисахаридных комплексов растительного происхождения на эффективность цитостатической терапии перевиваемых опухолей // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии: Материалы конференции. – Томск, 2005. – С. 23–5.
5. *Машиковский М.Д.* Лекарственные средства. – М.: «Новая волна», 2008. – 1206 с.
6. *Стенина М.Б.* // Паклитаксел в клинической практике / Под ред. Н.И. Переводчиковой. – М., 2003. – С. 81–117.
7. *Сычев И.А., Порядин Г.В., Смирнов В.М.* Действие полисахаридов на систему крови крыс // Бюлл. эксперим. биол. и медицины. – 2006. – № 5. – С. 530–3.
8. *Сычев И. А., Смирнов В. М., Порядин Г. В.* Механизм радиопротекторного действия полисахарида донника желтого – пектина // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2008. – № 1 (60). – С. 49–53.
9. Химиотерапия опухолевых заболеваний / Под ред. Н.И. Переводчиковой. – М., 2000. – 392 с.
10. *Bandyopadhyay A., Wang L., López-Casillas F. et al.* Systemic administration of a soluble betaglycan suppresses tumor growth, angiogenesis, and matrix metalloproteinase-9 expression in a human xenograft model of prostate cancer // Prostate. – 2005. – 63(1). – P. 81–90.
11. *Hana F., Yaa W., Yang X. et al.* Experimental study on anticoagulant and antiplatelet aggregation activity of a chemically sulfated marine polysaccharide YCP // International Journal of Biological Macromolecules. – 2005. – 36(4). – P. 201–7.
12. *Popov S.V., Popova G.YU., Ovodova R.G. et al.* Antiinflammatory activity of the pectic polysaccharide from *Comarum palustre* // Fitoterapia. – 2005. – 76(3–4). – P. 281–7.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ»

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(продолжение см. на стр. 108)

УДК 616.71-018.46-006.441:613.6.027

*Б.А. Бакиров, А.В. Варшавский, А.Б. Бакиров***ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЫ
НА ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ
В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН**

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа

Контактная информация:*Бакиров Булат Ахатович, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры Терапии ИПО БГМУ, врач-гематолог, анестезиолог-реаниматолог РКБ им. Г.Г. Куватова***адрес:** 450000, Республика Башкортостан, Уфа, ул. Ленина, д. 3; **тел.:** +7(917)776-99-88, +7(347)228-95-72**e-mail:** bbakirov@mail.ru

Статья поступила: 11.01.2010, принята к печати 01.04.2010.

Резюме

Выявлен рост заболеваемости хроническим лимфолейкозом в Республике Башкортостан в 1999–2008 гг. с преобладанием городских жителей над сельскими. Наиболее высокая заболеваемость выявлена в крупнейших промышленных городах республики. Выявлена достоверная связь между выбросами загрязняющих веществ в атмосферный воздух и показателями заболеваемости за последние 5 лет. Показано отсутствие различий в соотношениях генетических маркеров риска развития хронического лимфолейкоза между работниками предприятий с вредными условиями труда и жителями Республики Башкортостан.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, эпидемиология, заболеваемость, выбросы загрязняющих веществ, генетические маркеры.

*B.A. Bakirov, A.V. Varshavskii, A.B. Bakirov***THE EFFECTS OF LABOR ENVIRONMENT
ON THE INCIDENCE RATE OF CHRONIC LYMPHATIC LEUCOSIS
IN THE REPUBLIC OF BASHKORTOSTAN**

Bashkir state medical university, Ufa

Abstract

The study revealed an increase in the incidence rate of chronic lymphatic leucosis in the Republic of Bashkortostan in 1999–2008, with urban patients outnumbering rural ones. The highest morbidity was observed in major industrial cities of the Republic. A credible connection between pollutant emissions into the atmosphere and morbidity rates in the following 5 years was also determined. This study shows the absence of difference in the ratios of CLL risk genetic markers observed in hazardous-production workers and common residents of the Republic of Bashkortostan.

Key words: chronic lymphatic leucosis, epidemiology, morbidity, emissions of polluting substances, genetic markers.

Введение

Хронический лимфолейкоз – наиболее распространенный вид лейкоза в странах Европы и Северной Америки. В этих странах на его долю приходится 30 % от всех лейкозов [3]. Ежегодная заболеваемость составляет 3,0–3,5 на 100 000 населения, а для лиц старше 60 лет – до 20 на 100 000 населения [9; 14; 15]. Мужчины болеют чаще женщин в соотношении 2:1 [18]. Около 70 % больных заболевают в возрасте между 50 и 70 годами, средний возраст к началу заболевания составляет 55 лет. И только менее 10 % заболевают в возрасте до 40 лет, хотя некоторые авторы отмечают, что в последние годы возникновение ХЛЛ у лиц моложе 35 лет уже не является исключительной редкостью [19].

По литературным данным, число случаев смерти от профессионально обусловленных злокачественных новообразований может составлять от 4 до 28 % [5; 13; 16]. По экспертной оценке в РФ более 1,7 млн. человек работают в канцерогенно опасных отраслях промышленности (горные работы, металлургия, нефтехимия, резиновое производство и т.п.) [12].

Известно, что высокопролиферативная, мультифункциональная и морфодинамичная кроветворная система чрезвычайно быстро реагирует на различные воздействия окружающей среды, часто являющиеся

острыми или хроническими стрессами для организма. К последним относятся вредные промышленные производственные факторы, инициирующие гематологические заболевания. Особое место среди профессионально обусловленных изменений крови занимают анемии [7; 11]. В структуре этиологических факторов злокачественных гематологических опухолей преобладают химические канцерогены (90 %), тогда как 10 % приходится на физические факторы, ведущим из которых является ионизирующее излучение [2; 4; 6; 10]. Так же в литературе особенно серьезно обсуждается вопрос о канцерогенности диоксинов [1]. По данным литературы существует связь между воздействием гербицидов и частотой выявления ХЛЛ, ЛХ, НХЛ [17]. По данным Карамовой Л.М. [8] у больных, перенесших воздействие диоксинов, третье место среди опухолевых заболеваний занимают опухоли лимфатической и кроветворных тканей – 14,3 %.

Этиология ХЛЛ включает как влияние факторов внешней среды, так и генетические факторы. В последние годы был изучен ряд генов, продукты которых предположительно влияют на риск развития ХЛЛ, однако лишь для нескольких из них он был доказан. Это ген, отвечающий за синтез ФНО- α (TNF- α), главного регулятора супрессора опухолей p53 (MDM2) и антиоксиданта НАДФ(Н) хинон оксидоредуктазы (NQO1).

Материалы и методы

В работе применялись ретроспективные методы исследования по изучению заболеваемости больных ХЛЛ за 1999–2008 гг.

Обследуемая популяция – городское и сельское население Республики Башкортостан в возрасте от 0 до 90 лет. В разработке учтена следующая нозологическая форма по МКБ–10: С91.1 (хронический лимфолейкоз). Сбор данных осуществлялся с помощью республиканского реестра больных ХЛЛ.

Расчет показателя заболеваемости проводили по формуле:

$$Y = \frac{n}{N} \cdot \frac{10^5}{T}, \text{ где}$$

n – число впервые в жизни зарегистрированных случаев заболевания;

N – средняя численность популяции за время наблюдения;

T – время наблюдения (в годах).

Показатели заболеваемости рассчитывали на 100 000 взрослого населения в год. С целью оценки достоверности динамики показателей заболеваемости проводился регрессионный анализ с определением коэффициента регрессии с помощью программ «Биостатистика для Windows и DOS IBM-PC», «Statistica, версия 5.5А».

Сведения о количественном составе населения получены в Государственном комитете Республики Башкортостан по статистике.

Точные сведения об объемах выбросов и сбросах загрязняющих веществ в атмосферный воздух и поверхностные водные объекты за 10-летний период наблюдения (1999–2008 гг.) получены из Государственных докладов о состоянии природных ресурсов и окружающей среды Республики Башкортостан.

С целью исключения влияние генетической предрасположенности развития ХЛЛ на данные эпидемиологического исследования проведено молекулярно-генетическое исследование.

Объектом для молекулярно-генетического исследования служили образцы ДНК, выделенные из лимфоцитов периферической венозной крови 120 работников предприятия «Салаватнефтеоргсинтез».

Средний возраст обследованных работников, отобранных случайным образом, составил $35,57 \pm 1,42$ лет.

Половое соотношение выборки мужчины : женщины – 56,4 % (75) к 43,6 % (58). Все обследованные – жители Республики Башкортостан, из которых 46,6 % (62) – русских, 40,6 % (54) – татар, 12,8 % (17) – башкир.

В качестве контроля были использованы образцы ДНК 196 практически здоровых индивидов, жителей Республики Башкортостан, отобранных с учетом:

- возраста ($34,34 \pm 1,58$),
- половой принадлежности:
 - 107 мужчин – 54,6 %,
 - 89 женщин – 45,4 %,
- этнического состава
 - русские 97 человек (49,5 %),
 - татары 79 человек (40,3 %),
 - башкиры 20 человек (10,2 %).

Изучение полиморфных локусов -308G>A гена *TNFA*, 309T>G гена *MDM2*, 609C>T гена *NQO1* проводилось методом ПЦР синтеза ДНК.

Результаты

При изучении заболеваемости ХЛЛ в Республике Башкортостан за 1999–2008 гг. обнаружена тенденция к росту показателя с 1,48 в 1999 г. до 1,88 в 2008 г. Наибольший показатель заболеваемости наблюдался в 2007 г. и составил 2,47 на 100 000 человек взрослого населения (зарегистрировано всего 100 новых случаев заболевания).

Наименьший показатель (1,39) зарегистрирован в 2003 г., когда было выявлено 57 случаев вновь заболевших. Средние показатели заболеваемости ХЛЛ составили $1,56 \pm 0,06$ (1999–2003) и $2,2 \pm 0,10$ (2004–2008) (табл. 1).

Таким образом, исследование показателя заболеваемости наиболее четко демонстрирует тенденцию роста заболеваемости ХЛЛ в 2004–2008 гг. (табл. 1)

При сравнении заболеваемости городских и сельских жителей оказалось, что заболеваемость горожан статистически значимо выше, чем сельских жителей (табл. 2).

Наибольшая заболеваемость была зарегистрирована в крупных промышленных городах: Уфа, Стерлитамак, Салават (табл. 3).

Нами также проведена оценка степени влияния выбросов существующих производств и автотранспорта отдельных городов республики на заболеваемость ХЛЛ.

Изучалось влияние суммарных объемов выбросов в атмосферный воздух, влияние выбросов отдельных веществ (сернистый ангидрид, летучие органические соединения, диоксид азота, углерода оксид) в атмосферный воздух.

Выявлена достоверная корреляция между динамикой суммарных выбросов загрязняющих веществ в атмосферу за 1999–2003 годы и динамикой заболеваемости ХЛЛ в 2004–2008 гг. как в целом по Республике Башкортостан (коэффициент корреляции $r=0,83$; $p<0,05$), так и в городах Уфа ($r=0,86$; $p<0,05$), Стерлитамак ($r=0,87$; $p<0,05$) Салават ($r=0,60$; $p<0,05$).

По данным Министерства природопользования, лесных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Башкортостан определены основные приоритетные токсиканты, вносящие наибольший вклад в загрязнение атмосферы ряда промышленных центров республики (табл. 4).

Исследования позволили выявить достоверную корреляцию между динамикой выбросов летучих органических соединений ($r=0,91$; $p<0,05$), оксида углерода ($r=0,77$; $p<0,05$) и диоксида азота ($r=0,78$; $p<0,05$) в атмосферу за 1999–2003 гг. и динамикой заболеваемости ХЛЛ в Республике Башкортостан в 2004–2008 гг.

В то же время достоверной корреляции между динамикой суммарных выбросов в атмосферу за 2004–2008 гг. и динамикой заболеваемости ХЛЛ за аналогичный период времени не найдено. Повидимому, это связано с тем, что ответная реакция организма на токсическое воздействие вредных соединений имеет отсроченный эффект по времени.

Распределение частот генотипов изученных генов *TNFA*, *MDM2*, *NQO1* в группах больных и здоровых индивидов соответствовало ожидаемому по равновесию Харди-Вайнберга.

При сравнении общей выборки работников «Салаватнефтеоргсинтез» и группы контроля не выявлено достоверных различий по частотам генотипов полиморфных локусов -308G>A гена *TNFA*, 309T>G гена *MDM2*, 609C>T гена *NQO1* (табл. 5).

Таблица 1

Абсолютное число впервые зарегистрированных случаев и показатель заболеваемости ХЛЛ по Республике Башкортостан за период с 1999 по 2008 гг. на 100 000 взрослого населения

Годы	п больных	Заболеваемость	Средний показатель за 5 лет
1999	61	1,48	1,56±0,06
2000	66	1,61	
2001	71	1,74	
2002	65	1,59	
2003	57	1,39	
2004	86	2,11	2,2±0,10
2005	90	2,22	
2006	93	2,3	
2007	100	2,47	
2008	76	1,88	

Таблица 2

Абсолютное число зарегистрированных случаев и показатель заболеваемости ХЛЛ среди городских и сельских жителей за 1999–2008 гг.

Годы	п больных		Среднегодовая заболеваемость (на 100 000 населения)	
	Город	Село	Город	Село
1999–2003	247	73	2,00	0,91
2004–2008	326	119	2,60	1,50

Таблица 3

Показатель заболеваемости ХЛЛ среди жителей крупных помышленных городов Республики Башкортостан за 1999–2008 гг.

Город	Среднегодовая заболеваемость (на 100 000 населения)	
	Годы	
	1999–2003	2004–2008
Уфа	1,22	1,772
Стерлитамак	1,286	1,379
Салават	0,631	1,219

Таблица 4

Вещества с наибольшими показателями загрязнения атмосферы в городах Республики Башкортостан в 1999–2003 гг.

Города	Загрязняющие вещества
Уфа	Оксид азота, бенз(а)пирен, оксид углерода, диоксид азота
Стерлитамак	Бенз(а)пирен, хлорид водорода, диоксид азота
Салават	Бенз(а)пирен, диоксид азота

Выводы

1. Среди взрослого населения Республики Башкортостан в 2004–2008 гг. отмечается статистически достоверный рост показателей заболеваемости, причем наиболее высокие показатели заболеваемости отмечены у городских жителей, чем у сельских.
2. Имеется достоверная корреляция между динамикой суммарных выбросов загрязняющих веществ в атмосферу, отдельных токсикантов (летучие органические соединения, оксид углерода, диоксид азота) и динамикой заболеваемости ХЛЛ в последующие 5 лет.
3. Молекулярно-генетический анализ полиморфных локусов показал отсутствие влияния генетических факторов на уровень заболеваемости ХЛЛ.

Литература

1. Бочкарева О.В. Особенности онкологической заболеваемости у детей в условиях техногенного воздействия на окружающую среду // Диоксины: Экологические проблемы и методы анализа: Материалы конференции. Уфа, 1995. – С. 201–24.
2. Булдаков Л.А., Гуськова А.К. 15 лет после аварии ан Чернобыльской АЭС // Радиационная биология. Радиозология. – 2002. – Т. 42, № 2. – С. 228–233.
3. Волкова М.А. Полвека в терапии хронического лимфолейкоза // Гематология и трансфузиология. – 1998. – № 5. – С. 6–12.
4. Голенков А.К. Влияние производственных и экологических факторов на кроветворную и иммунную системы (обзор литературы) // Гиг. труда. – 1991. – № 11. – С. 37–9.
5. Долл П., Пито П. Причины рака. – Киев: Наукова думка, 1984. – 248 с.
6. Захаров В. Н., Караулов А. В., Соколов В. В., Фраш В. Н. Изменения системы крови при воздействии радиации и бензола. / Под ред. И.И. Гительзон. – Новосибирск: Наука, Сибирское отделение, 1990. – С. 213–39.
7. Иванов А.И., Ильина В.А. Принципы организации гематологической помощи // Тезисы докл. конф. гематологов РСФСР. – Л., 1987. – С. 259–60.

Таблица 5

Частоты генотипов и аллелей полиморфных локусов -308G>A гена *TNFA*, 309T>G гена *MDM2*, 609C>T гена *NQO1* в группах работников «Салаватнефтеоргсинтез» и контроля

Локус	Генотипы и аллели	Работники	Контроль	χ^2	p	OR (95 %CI)
		N _i , p _i	N _i , p _i			
-308 G>A <i>TNFA</i>	GG	86 71,7	127 64,8	1,302	0,255	1,375 (0,839-2,252)
	GA	33 27,5	64 32,7	0,703	0,403	0,783 (0,475-1,29)
	AA	1 0,8	5 2,6	0,437	0,509	0,322 (0,037-2,786)
	G	205 85,4	318 81,1	1,634	0,202	1,363 (0,879-2,114)
	A	35 14,6	74 18,9	1,634	0,202	0,734 (0,473-1,139)
309 T>G <i>MDM2</i>	TT	52 43,3	45 38,1	0,468	0,494	1,241 (0,739-2,083)
	TG	61 50,8	59 50	0,000	1,000	1,034 (0,622-1,72)
	GG	7 5,8	14 11,9	1,993	0,159	0,461 (0,179-1,186)
	T	165 68,8	149 63,1	1,430	0,233	1,285 (0,879-1,879)
	G	75 31,3	87 36,9	1,430	0,233	0,779 (0,533-1,139)
609 C>T <i>NQO1</i>	CC	73 60,8	99 61,5	0,000	0,991	0,973 (0,599-1,58)
	CT	40 33,3	53 32,9	0,003	0,957	1,019 (0,617-1,684)
	TT	7 5,8	9 5,6	0,030	0,863	1,047 (0,378-2,895)
	C	186 77,5	251 78	0,001	0,981	0,975 (0,652-1,456)
	T	54 22,5	71 22	0,001	0,981	1,027 (0,687-1,534)
	N	124	196	–	–	–

Литература (окончание)

- Карамова Л.М., Башарова Г.Р. Диоксины и онкопатология // Уральский медицинский журнал. – 2008. – № 11. – С. 63–5.
- Клиническая онкогематология: Руководство для врачей / Под. ред. М.А. Волковой. – М.: Медицина, 2001. – 576 с.
- Кошурникова Н.А., Гильберт Э., Сокольников М.Э. и др. Канцерогенный риск при внутреннем облучении от инкорпорированного плутония (основные итоги эпидемиологического исследования среди персонала ПО «Маяк») // Мед. радиол. и радиац. безопасность. – 2001. – Т. 46, № 6. – С. 30–7.
- Осечинский И.В., Туроббаева М.В., Кубанцева И.В. Актуальные вопросы анемий // Тезисы докл. науч.-практ. конф. – Уфа, 1989. – С. 18–21.
- Смулевич В.Б., Соленова Л.Г. Производственные канцерогены и здоровье населения // Гиг. и сан. – 1997. – № 4. – С. 22–5.
- Assessment of technologies for determination cancer risk from environment / Congr. US // Wash/(DC):office technol. Assessment. 1981.
- Cheson B.D., Bennett J.M., Grever M. et al. National Cancer Institute-Sponsored Working Group Guidelines for Chronic Lymphocytic Leukemia: Revised Guidelines for Diagnosis and Treatment // Blood. – 1996. – 87. – P. 4990–7.
- Finch S.C., Hoshino T., Itoda T. et al. Chronic lymphocytic leukemia in Hiroshima and Nagasaki, Japan // Blood. – 1969. – 33. – P. 79–86.
- Hueper W.C. Environmental cancer hazards // J. Occuh. Med. – 1972. – 14(2). – P. 149–53.
- Institute of Medicine (2002) Veterans and Aent Orange: Update 2002. Washington, DC: National Academy Press.
- Petrucci M.T., Ricciardi M.R., Gregorj C. et al. Disease progression in B-cell is associated with reduced levels of apoptosis and enhanced p27 expression // Blood. – 1998. – 92. – P. 633a.
- Rai K.R., Patel D.V. Haematology. – N.Y., London, 1997. – P. 1308–22.

УДК 575.113:616-092.9:615.36.018.1

*Н.В. Андропова, Н.Т. Райхлин, Е.М. Трешалина, Н.В. Шалунова, А.Ю. Барышников***РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ
ОНКОГЕННЫХ ПОТЕНЦИЙ МЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ
НА ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ МЫШАХ**

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора РФ

Контактная информация:*Андропова Наталья Владимировна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории комбинированной терапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей***адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.:** +7(499)612-81-39**e-mail:** treshalina@yandex.ru

Статья поступила: 14.12.2009, принята к печати 01.04.2010.

Резюме

В работе дан краткий обзор показаний к применению МИБП и описана методика изучения онкогенных потенциалов (туморогенности) на иммунодефицитных мышцах *Balb/c nude* разведения РОНЦ 6 новых клеточных препаратов, предназначенных для клинического применения: 2 культур диплоидных клеток человека, полученных из легкого эмбриона (штаммы ЛЭЧ 4/81 и MRC-5), 1 культуры фибробластов (штамм *cmbt-F*), 1 новой противоопухолевой вакцины «Мелавак» из культуры γ -облученных клеток меланомы человека *Mel Kor*, 2 препаратов культур аутологичных хондропрогениторных клеток из МСК, иммобилизованных в трехмерных матриксах (скаффолдах) коллагеновых или из орто-полимолочной кислоты (OPLA), и одного имплантата-носителя из пористого титана, предназначенного для иммобилизации ЛАК человека. Показано, что мыши *Balb/c nude* пригодны для изучения туморогенности современных иммунобиологических препаратов. Сделаны выводы об отсутствии туморогенности у всех изученных агентов. Выбор в качестве отрицательного контроля адекватной культуры опухолевых клеток позволяет верифицировать опухолевый процесс. Визуальная и патоморфологическая оценка патологических изменений в зонах имплантации и возможной локализации метастазов клеточного материала или его носителя дают возможность выявить признаки реактивного воспаления для дифференциальной диагностики со специфическим поражением. Носители клеточного материала любого происхождения провоцируют пролиферацию соединительнотканых элементов хозяина, на фоне которой трудно достоверно верифицировать жизнеспособные потенциально злокачественные клетки, что требует более длительного наблюдения и повторной морфологической верификации.

Ключевые слова: онкогенные потенциалы, медицинские клеточные препараты, иммунодефицитные мыши.*N.V. Andronova, N.T. Raichlin, H.M. Treshalina, N.V. Shalunova, A.Yu. Baryshnikov***INVESTIGATION OF TUMORIGENICITY
THE DIFFERENT CELL PREPARATIONS
ON IMMUNODEFICIENT MICE**

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow

FSInstitutions, SRIs for standardization and control of medical biological preparations named of L.A. Tarasevich

Abstract

In this study we present a short observation of the medical prescription for different medical immunobiology preparations, and described the methods of investigation of tumorigenic potency on genetically immunocompromise *Balb/c nude* mice breded at the Blokhin's Russian Cancer Center cell for new 6 cell preparations and one matrix for cell cultures recommended for medical employment. We have examined two human diploid karyotype cell lines, obtained from lung of embryo (LACH 4/81 and MRC-5), one cell culture of fibroblasts (*cmbt-F*), one new anticancer vaccine «Melavak» from the X-ray radiated cell culture of human melanoma *Mel Kor*, two cultures of autological chondroprogenicity cell from human MSC immobilized in triplet matrix (scaffolds) with collagen, OPLA, or porous titan, recommended for human LAC. We show, that *Balb/c nude* mice are adequate for tumorigenicity investigation of cell preparations as the biological products. All of tested preparations were non-tumorigenic. The choice of adequate cancer cell culture is the good as a negative control allows to verify the tumor growth. Visual and morphological characteristics of implantation zones or lymphatic metastases sites give a possibility to reveal such side effects as the reactive inflammation for differential diagnoses of specific cancer pathology. The cellular biologics induce the host connective tissue proliferation making of difficult to verify the living malignant tumor cells. This requires more long follow up period with repeated morphological control.

Key words: tumorigenicity, medical cell preparations, immunodeficient *Balb/c nude* mice.**Введение**

В последние годы в России принят ряд важных правительственных решений по вопросам развития высокотехнологичных видов медицинской помощи, среди которых – открытие новых криобанков для клеточных культур, основы клеточных МИБП [21]. Предпосылкой этому были разработки и успешное приме-

нение многих клеточных препаратов на основе различных функционально активных клеток [2; 6–10; 11; 26; 35; 38; 39; 41]. МИБП проявляют регуляторно-репаративное и иммуностимулирующее действие, ориентированное на различные терапевтические цели. Соответственно свойствам МИБП используются для посттравматической реконструкции тканей, тканевой инженерии крупных сосудов [4–6; 23; 25].

Есть данные об использовании таких моделей в лечении инсулин-зависимого сахарного диабета [26; 34; 39; 40; 41], производстве противоинфекционных или противоопухолевых вакцин и/или для заместительной терапии [2–4; 8; 10–12; 23; 24; 29; 35; 39; 42]. На доклинической стадии изучаются мезенхимальные и эмбриональные стволовые клетки (МСК, ЭСК), способные к переживанию *in vivo* [8; 19; 22; 35]. Поскольку имплантаты из культур клеток *in vivo* достаточно уязвимы для иммунологического надзора хозяина, разрабатываются методы иммобилизации с использованием различных матриц в виде близких к структуре губчатой кости микро- или трехмерных капсул (скаффолдов), в том числе из металлов [17; 18; 26; 36; 37]. Однако при этом возрастает опасность малигнизации клеток внутри «скаффолда» *in vivo*, не только в результате исключения иммунной реакции на атипичные клетки, но и по причине реставрации исходного клеточного фенотипа. Морфологические исследования срезов могут выявить возможную атипичию, но только в мягких материалах. Канцерогенная или мутагенная активность некоторых металлов (никель или хром) известны, а онкогенные потенциалы современных пористых материалов из других металлов, например, титана, не изучены [1]. Применение новых МИБП невозможно без доклинического изучения их безопасности, что регламентировано рядом документов [14–15; 21]. Одним из обязательных разделов доклинического изучения МИБП является определение онкогенных потенциалов или туморогенности, т.е. способности вызывать развитие злокачественной опухоли. Для выявления этого побочного действия на доклиническом этапе в настоящее время используются различные методики, наиболее достоверной из которых является п/к имплантация клеточного препарата мышам, лишенных трансплантационного иммунитета. Среди рекомендованных для изучения туморогенности животных – обычные иммунокомпетентные мыши, депрессированные классическими иммунодепрессантами (цик-лоспорином, азатиоприном, имураном, циклофосфаном, АЛС, АТС или антилимфоцитарным иммуноглобулином) или наследственные ИДМ, полученные нокаутированием генов, ответственных за трансплантационный иммунитет.

Обычные иммунокомпетентные мыши дешевле и не требуют особых условий содержания, но биологически не вполне адекватны для современных МИБП. Но применение депрессанта создает не длительную, а временную иммуносупрессию, что не дает возможности достоверно оценить отдаленные проявления туморогенности, особенно при изучении иммобилизованных или инкапсулированных на носителях препаратов с отсроченным эффектом [28; 31; 42]. Кроме того, наличие индуцированной системной иммуносупрессии, подавляющей все иммунные клеточные реакции, не дает возможности выявить пролиферативную активность клеток в лимфатических узлах (мишенях возможного метастазирования) и дифференцировать ее от воспалительных изменений при применении нестерильных объектов. ИДМ биологически интактны, т.к. не подвергаются экзогенным иммунодепрессивным воздействиям и вследствие этого могут давать адекватный биологический ответ на наличие туморогенности как в отношении опухолевого узла, так и диссеминации процесса [42]. Важно то, что в качестве контроля в опытах на ИДМ параллельно используется группа животных, которым имплантируется такое же количество раковых

клеток с близким к исследуемому препарату гистогенезом из доступных коллекций культур клеток [10; 20], что дает возможность иметь доказательный отрицательный результат. Для подтверждения значимости указанной модели с использованием ИДМ при изучении онкогенных потенциалов МИБП различного происхождения, состава и назначения было предпринято настоящее исследование.

В исследование включены МИБП интактные, в том числе нестерильные, и иммобилизованные на различных носителях, включая скаффолды из пористого титана.

Цель. На иммунодефицитных мышах *Balb/c nude* оценить результативность выявления онкогенных потенциалов современных иммунобиологических препаратов, предназначенных для клинического применения.

Задачи

1. Составление плана экспериментального исследования для каждого МИБП или иммобилизуемого объекта;
2. Выбор адекватной культуры опухолевых клеток для группы контроля;
3. Выявление признаков опухолевого роста или метастазирования и контроль скорости роста пальпируемых новообразований при визуальном наблюдении места имплантации/инокуляции;
4. Выявление морфологических признаков опухолевого роста или метастазирования в месте имплантации/инокуляции и области регионарного и отдаленного метастазирования;
5. Выявление визуальных и патоморфологических признаков реактивного воспаления в зонах возможной локализации метастазов и дифференциальная диагностика со специфическим поражением.

Материалы и методы

Животные

Для экспериментов использованы конвенциональные 8–9 нед мыши-самки *Balb/c nude* массой тела 19–21 г. из разведения РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, которых содержали в специализированном кондиционированном отсеке (2 зоны) на стерильных бумажной подстилке, экструдированном корме («МЭСТ», РФ) и питьевой воде. В каждой группе было 60–70 мышей, которых делили на 2 группы по 30–35 особей (опыта и контроля). В опытную группу входили мыши, которым однократно подкожно выполняли инъекцию по 1 млн. исследуемого клеточного препарата или подшивали один скаффолд – имплантат-носитель (ИН) пустой или содержащий 1 млн. исследуемых клеток. Для групп контроля культуры опухолевых клеток человека получали из Банка опухолевых штаммов РОНЦ [27] или из Российской коллекции клеточных культур [20] и вводили мышам однократно подкожно по 1 млн. клеток. Контролем для препаратов, полученных из легкого эмбриона человека, служила линия клеток рака легкого человека *A-549*; для препаратов, полученных из фибробластов или МСК, – линия клеток рака кожи человека *A-431* [27], для вакцины «Мелавак» – исходная культура клеток меланомы человека *Mel Kor* [16]. До перевивки по прижизненной окраске трипановым синим определено 98 % живых клеток в культуре.

Изученные агенты

Всего изучено 7 образцов. Среди них 4 нативных клеточных препарата, в том числе 2 культуры диплоидных клеток человека, полученных из легкого эмбриона (штаммы ЛЭЧ 4/81 [9] и MRC-5 [34]), 1 культура фибробластов (штамм *cmbt-F* [40]), 1 новая противоопухолевая вакцина «Мелавак» из культуры клеток меланомы человека *Mel Kor*, подвергнутой ионизирующему облучению [1], 2 препарата культуры аутологичных хондропрогениторных клеток из МСК, иммобилизованных в трехмерных скаффолдах коллагеновых или *OPLA* [22], а также ИН из пористого титана, предназначенные для иммобилизации ЛАК человека [7; 20].

1. *Штамм ЛЭЧ 4/81*. Медицинский иммунобиологический препарат «Культуры клеток диплоидных человека для заместительной терапии» (ККДЧ) представляет собой культуру диплоидных клеток легкого эмбриона человека ЛЭЧ 4/81 (Спецификация ATCC на CCL 5; ECACC 89111004; ECKK. LECH-4), которая получена однократно в Екатеринбургском НИИ вирусных инфекций МЗ РФ в 1972 г. Препарат представляет собой морфологически однородную популяцию клеток с ограниченным сроком жизни, определенного тканевого происхождения, имеющих частичную дифференцировку, по фенотипу – фибробластоподобную. Культура клеток сохраняет стабильный кариотип (2n не менее 75% клеток), лишена антигенов гистосовместимости (HLA). В предварительных опытах на обычных мышцах, обработанных антитимочитарной сывороткой (СП 3.3.2.561-96) установлено отсутствие туморогенности. Клеточная 3–4-суточная культура на 10-м пассаже в лекарственной форме с концентрацией 50–100 000 клеток в 1 мл/см² рекомендована для лечения глубоких поражений кожных и слизистых покровов. Препарат производится ООО Компании «Медицина и биотехнологии» (Екатеринбург).
2. *Штамм MRC-5*. Линия диплоидных клеток человека MRC-5 представляет собой клеточную взвесь и является субстратом для производства вакцины против краснухи. MRC-5 получена из легкого эмбриона человека (автор Дж.П. Джекобс, 1966 г.) и закуплена на 14 пассаже в ATCC (спецификация ATCC на CCL-171). Исследование выполнено с 23-м пассажем MRC-5, последние 3 пассажа велись без добавления антибиотика. Препарат производится ФГУП НПО «МИКРОГЕН» МЗ РФ (Москва).
3. *Штамм cmbt-F/7*. Субстанция клеточной культуры диплоидных фибробластов человека *cmbt-F/7* является суспензией живых, функционально активных клеток, обладающих выраженным регуляторно-репаративным действием, с пролонгированным до 7 дней эффектом, связанным с переживанием клеток. Культура представлена морфологически однородной популяцией пластик-адгезивных веретенообразных клеток (индекс пролиферации ≥ 2), предварительно культивированной на искусственных питательных средах, стерильной. Клетки экспрессируют человеческие аллели главного комплекса гистосовместимости и синтезируют коллаген I и II типа. *Cmbt-F/7* обладает ранозаживляющим действием, стимулирует рост

новых микрососудов, улучшая трофику тканей, стимулирует регенерацию поврежденных тканей кожи, слизистых оболочек. Препарат производится ООО «Центр медико-биологических технологий – ЦМБТ-Лабораторис» (Москва).

4. *Вакцина «Мелавак»* представляет собой клеточную линию меланомы человека *Mel Kor* стабильно трансфицированную человеческим геном ГМ-КСФ, имеет генетическую конструкцию: вектор *pBK-CMV (Clon Tech, США)* со встроенной к ДНК ГМ-КСФ человека. Вид трансфекции – стабильная, интегрированная. Трансфекция – липофекция при помощи набора *Unifectin 56*. Уровень трансфекции – 100%. Количество секретируемого ГМ-КСФ клетками – 78,1–84,0 нг/1 млн. клеток /24 часа. Перед введением животным вакцина инаktivирована на γ -установке АГАТ-Р облучением в дозе 100 Гр. Вакцина предназначена для клинического изучения у больных меланомой кожи в качестве средства иммунотерапии, производится РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.
- 5-6. *Иммобилизованная культура дифференцированных МСК*. Хондропрогениторные клетки человека получены из МСК, выделенных в результате липосакции из подкожно-жировой клетчатки пациентов по оригинальной методике [23]. Митотический индекс для каждой популяции клеток не менее 1×10^6 . Направленная дифференцировка МСК в хондропрогениторные клетки выполнена с помощью *TGF β 1* 100 нг/мл в дифференцировочной среде *DMEM-LG* с антибиотиками без сыворотки. Клетки трипсинизированы и подсчитаны, через 3 нед. фиксированы и окрашены толуидиновым синим, сафронином O, *alcian blue*. Для культивирования использован внеклеточный матрикс (ВМ), представляющий собой природную подложку для тканевого развития и репарации тканей. Для получения трехмерной структуры использованы продажные (РФ, Германия) матриксы – коллагеновые или на основе *OPLA*, которые насыщались полученной культурой клеток. ГТИ стерильны, переданы на исследование в физиологическом растворе хлористого натрия в центрифужных пробирках объемом 15 мл. После извлечения из среды ГТИ готов для трансплантации. Препарат произведен в ООО «Институт стволовой клетки» (Москва).
7. *Имплантаты-носители из пористого титана для ЛАК*. Имплантат-носитель (ИН) представляет собой пористый титан, полученный из спеченного титанового порошка. После спекания порошинки образуют упругий прочный каркас с открытыми порами размером 50 ± 200 мкм, подобно губчатому веществу бедренной кости человека. ИН производится ООО «Центр информационно-клеточной медицины» (Москва).

Оценка онкогенных потенциалов

Исследования выполнены в соответствии с методическими указаниями [15]. Визуальный контроль места имплантации/инокуляции и признаков реактивного воспаления за опытными и контрольными группами мышей производился в течение 21 сут. в случае нативного препарата и 56 дней в случае иммобилизованного на носителе.

В процессе наблюдения фиксировали гибель мышей от внешних причин, связанных с наличием иммунодефицита. На 21 сут после инокуляции или имплантации тестируемых образцов всех мышей умерщвляли с помощью передозировки эфирного наркоза и подвергали аутопсии.

При вскрытии мышей макроскопически оценивали состояние внутренних органов: кожи в месте введения, регионарных подколенных и аксиллярных лимфатических узлов, легких, почек и печени для выявления каких-либо поражений, напоминаящих опухоль.

Регионарные лимфатические узлы и легкие подвергали гистологическому исследованию. Морфологические признаки опухолевого роста, метастазирования или реактивного воспаления выявляли путем стандартного гистологического исследования материала, который фиксировали в 10 %-ном нейтральном формалине, заключали в парафин. Из парафиновых блоков готовили срезы толщиной 5–7 мк и окрашивали гематоксилин-эозином. Препараты просматривали и фотографировали в световом микроскопе «Поливар» (Австрия). В полученных гистологических препаратах оценивали наличие признаков злокачественного роста, а также воспалительных изменений.

Статистическая обработка данных

Использован стандартный метод Стьюдента в модификации Р.Б.Стрелкова для обработки параметров роста пальпируемых опухолей.

Завершение эксперимента

В соответствии с Правилами работы с лабораторными животными выживших животных умерщвляли путем передозировки эфирного наркоза. Трупы погибших или умерщвленных мышей подвергали замораживанию и кремировали в специализированном подразделении РОНЦ.

Результаты и обсуждение

В течение всего периода наблюдения за мышами в области инокуляции или имплантации стерильных нативных клеточных препаратов (ЛЭЧ 4/81, *cmbt-F/7*, вакцина «Мелавак») каких-либо визуальных или морфологических признаков опухолевого роста в месте введения, внутренних полостях и органах, метастазирования или реактивного воспаления не обнаружено.

Выводы

1. Иммунодефицитные бестимусные мыши *Nude* удовлетворяют цели изучения онкогенных потенциалов современных иммунобиологических препаратов, предназначенных для клинического применения.
2. Выбор адекватной культуры опухолевых клеток для группы контроля позволяет верифицировать опухолевый процесс в качестве отрицательного контроля.
3. Визуальная и патоморфологическая оценка патологических изменений в зонах имплантации и возможной локализации метастазов клеточного материала или его носителя дает возможность выявить признаки реактивного воспаления для дифференциальной диагностики со специфическим поражением.
4. Носители клеточного материала любого происхождения провоцируют пролиферацию соединительно-тканых элементов хозяина, на фоне которой трудно достоверно верифицировать жизнеспособные потенциально злокачественные клетки, что требует более длительного периода наблюдения и повторной морфологической верификации.

При визуальном обследовании и многократной пальпации (1 раз в 5 дней) мышей, получивших нестерильный образец 23-го пассажа *MRC-5*, каких-либо визуальных или морфологических признаков опухолевого роста не обнаружено.

Однако у 7 мышей в этой группе при визуальном обследовании обнаружен двусторонний регионарный лимфаденит (подколенные лимфоузлы). Гистологическое исследование выявило лимфаденит в 2-х группах подколенных и аксиллярных лимфоузлов, не дающий возможности оценить истинную картину.

При дополнительном исследовании стерильного образца *MRC-5* эти изменения отсутствовали. При изучении иммобилизованных препаратов показано, что в случае использования скаффолдов коллагеновых или *OPLA*, насыщенных клеточным материалом человека, каких-либо визуальных или морфологических проявлений туморогенности нет.

Однако через 4–7 дней начиналось постепенное вращание фибробластов мышцы в скаффолд, и к концу наблюдения инокулят оказывался практически вытесненным.

Склерозирование микширует реальную картину состояния клеток, в том числе – возможную малигнизацию. При использовании ИН из пористого титана пустых или насыщенных ЛАК признаков туморогенности также не выявлено, однако интенсивная реакция соединительнотканых элементов мышцы даже на пустые носители была выражена более резко.

Для выяснения судьбы попавших в зоны склерозирования имплантированных клеток ИН были подшиты в брюшную полость обычных мышей, и оказалось, что в прослойках соединительной ткани находится большое количество жизнеспособных клеток с митозами. Рост опухолей человека у мышей контрольных групп после инокуляции 1 млн клеток на мышью был стандартным по срокам появления и скорости роста пальпируемых подкожных узлов, но при неполной прививаемости: в случае *A549* опухоли появились у 68–71 % мышей, в случае *A-431* – у 43–46 % животных.

Исключение составила культура клеток *Mel Kor*, которая дала 100%-ную прививаемость. Морфологическое исследование подтвердило развитие специфического опухолевого поражения и отсутствие признаков метастазирования для всех использованных контрольных опухолевых культур, что характерно для использованных моделей.

Литература

1. *Авцын А.Б.М.* Микроэлементы человека: этиология, классификация, органопатология. – М.: Медицина, 1991. – 496 с.
2. *Беникова Е.А., Турчин И.С., Белякова Л.С. и др.* Опыт лечения детей, страдающих сахарным диабетом, при помощи алла- и ксенотрансплантации культуры островковых клеток поджелудочной железы // Проблемы эндокрин. – 1987. – №2. – С. 19–22.
3. *Блюмкин С.Н., Скалецкий Н.Н., Попов В.Л. и др.* Внеселезеночная трансплантация культур островковых клеток поджелудочной железы плодов человека крысам с экспериментальным сахарным диабетом // Бюл. Эксп. Биол. и мед. – 1983. – №5. – С. 89–91.
4. *Бурякова Л.Б., Капланский А.С., Андреева Е.Р. и др.* Особенности формирования костной мозоли у крыс после введения в область перелома мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, культивированных при различном содержании кислорода // Клет. Транспл. – 2009. – Т. IV, № 3. – С. 52–7.
5. *Григорян А.С., Гилерович Е.Г., Павличенко Н.Н. др.* Влияние трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на посттравматические процессы при экспериментальной травме головного мозга // Клет. Транспл. – 2009. – Т. IV, № 3. – С. 58–67.
6. *Григорян А.С., Кругляков П.В.* Применение в тканевой инженерии крупных сосудов трансплантатов на основе аутогенных мононуклеарных клеток костного мозга // Клет. Транспл. – 2009. – Т. IV, № 3. – С. 37–41.
7. *Давыдов М.И., Нормантович В.А., Киселевский М.В. и др.* Адоптивная иммунотерапия при опухолевых плевритах. Клинико-лабораторное исследование // Российский онкологический журнал. – 2000. – № 6. – С. 14–7.
8. *Донцов В.И., Чернилевский В.Е.* Пересадка эмбриональных клеток: новые возможности в биологии и медицине // Ж. Профилактика старения. – 2001. – Вып.4. – С. 78–84.
9. *Зорин В.Л., Зорина А.И., Черкасов В.Р.* Анализ зарубежного рынка регенеративной медицины // Клет. Транспл. – 2009. – Т. IV, № 3. – С. 68–78.
10. *Кармацких О.Л., Ерофеев С.А., Кононович Н.А. и др.* Опыт использования иммунологического препарата диплоидной клеточной культуры ЛЭЧ-4 (81) для замещения локального дефекта костной ткани длинных трубчатых костей собак // Гений ортопедии: научно-теоретический и практический журнал. – 2006. – № 1. – С. 17–21. – ISSN 1028-4427.
11. *Комиссаренко В.П., Турчин И.С., Комиссаренко И.В. и др.* Трансплантация культуры островковых клеток поджелудочных желез плодов человека и животных как метод лечения сахарного диабета // Врач. Дело. – 1983. – № 4. – С. 52–6.
12. *Кругляков П.В., Григорян А.С.* Рецензия на книгу «Биология стволовых клеток и клеточные технологии» под редакцией М.А. Пальцева // Клет. Транспл. – 2009– Т. IV, № 3. – С. 79–80.
13. Методические указания «Выделение, культивирование и контроль штаммов диплоидных клеток». Одобрено Советом ГИСК им. Л.А. Тарасевича МЗ СССР, протокол №14 от 29.09.1978 г. МЗ СССР. – М., 1979. – С. 37.
14. Методические указания «Аттестация перевиваемых клеточных линий – субстратов производства и контроля медицинских и иммунобиологических препаратов». – РД-42-28-10-89. – МЗ СССР. – М., 1989. – С. 10–21.
15. Методические указания «Доклинические испытания новых медицинских иммунобиологических препаратов. Основные положения». – РД42-28-8-89. – МЗ СССР. – М, 1989. – С. 26.
16. *Михайлова Л.М., Ермакова Н.П., Меркулова И.Б.* Исследование туморогенности противоопухолевой вакцины мелавак // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 1. – С. 60–1.
17. *Новиков И.И.* Морфологические изменения губчатого вещества кости после его трансплантации под фиброзную капсулу почки // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1972. – № 1. – С. 31–7.
18. *Панарин Е.Ф., Нудьга П.А., Петрова В.А. и др.* Матрицы для культивирования клеток кожи человека на основе природных полисахаридов – хитина и хитозана // Клет. Транспл. – 2009. – Т. IV, № 3. – С. 42–6.
19. *Панин А.М., Иванов С.Ю., Нури Ф. и др.* Морфологическое изучение тканевых реакций на подкожную имплантацию биоматериалов // Биомедицинская технология. Репродукция тканей и биопротезирование. – 2001. – № 17. – С. 55–63.
20. *Полянская Г.Г.* Российская коллекция клеточных культур, Коллекция: ATCC CCL 185; ECACC 86012804, НИИ вирусологии РАМН; НИИ гриппа РАМН; ИНЦ РАН.-J.Natl.Cancer Inst. 1973. 51: 14171423; Int. J. Cancer 1976. 17: 6270; Tissue Antigens 1978. 11: 279.
21. *Путин В.В.* О единой национальной системе высокотехнологичной медицинской помощи. Порядок открытия новых медицинских центров, лабораторий, криобанков в России Стенографический отчет о совещании по вопросам развития высокотехнологичных видов медицинской помощи <http://www.biocells.ru/vip-money-5-5.html>.
22. *Тепляшин А.С., Коржикова С.В., Шарифуллина С.З. и др.* Дифференцировка мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга человека в клетках хрящевой ткани при культивировании их в трехмерных матриксах OPLA // Ж.Цитология. – 2007. – Т. 49, № 7. – С. 544–51.

23. Трансплантология: Руководство / Под ред. В.И. Шумакова. – М.: Медицина, 1995. – 391 с.
24. Шумаков В.И., Блюмкин В.Н., Скалецкий Н.Н. и др. Трансплантация культур островковых клеток поджелудочной железы (очерки). – М.: Медицина, 1994. – 384 с.
25. Третьяк С.И. Длительное сохранение жизнеспособности аллогенных тканей в сосудах и сердце реципиента (экспериментальное исследование). Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. – Минск, 1996. – 33 с.
26. Третьяк С.И., Прохоров А.В., Глинник А.А. Отдаленные результаты ксенотрансплантации макроинкапсулированной культуры островковых клеток поджелудочной железы // Трансплантология. – 2004. – Т. 7, № 3. – С. 364–6.
27. Трещалина Е.М., Ревазова Е.С., Соловьев Ю.Н. и др. Коллекция опухолевых штаммов человека / Под ред. акад. РАН и РАМН, засл. деятеля науки РФ, проф., д.м.н. М.И. Давыдова. – М.: «Практическая медицина», 233 с.
28. Трещалина Е.М., Андропова Н.В., Райхлин Н.Т. Изучение онкогенных потенциалов различных иммунобиологических препаратов на иммунодефицитных мышах // Российский биотерапевтический журнал. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты». – 2009. – Т.8, №2. – С. 22.
29. Appel J.Z., Alwayn J.P.N., Cooper D.K.C. Xenotransplantation: the challenge to current psychological attitudes // Progress in Transplantation. – 2000. – 10(4) – P. 217–25.
30. Abbas A.K., Murphy K.M., Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes // Nature. – 1996. – 383. – P. 1059–66.
31. Badet L., Titus T. The interaction between rimate blood and mouse islets induces accelerated clotting with islet destruction // Xenotransplantation. – 2002. – 9. – Issue 2. – P. 91.
32. Brunetti P., Basta G. Immunoprotection of pancreatic islet grafts within artificial microcapsules // Int.J.Artif.Organs. – 1991. – 14. – P. 789–91.
33. De Vos P., Wolters G.H. Obstacles in the application of microencapsulation in islet transplantation // Int. J. Artif. Organs. – 1993. – 16. – P. 205–12.
34. De Vos P., De Haan B.J. Association between capsule diameter, adequacy of encapsulation and survival of microencapsulated rat islet allografts // Transplantation. – 1996. – 62. – P. 893–9.
35. Jacobs J.P., Jones C.M., Baille J.P. Characteristics of a human diploid cells designated MRC-5 // Nature. – 1970. – 227. – P. 168–70.
36. Juang J.H., Bonner-Weir S., Vacantu J.P. et al. Outcome of subcutaneous islet transplantation improved by a polymer device // Transpl. Proc. – 1995. – 27. – P. 3215–6.
37. Lanza R.P., Hayes J.L., Chic W.L. Encapsulated cell technology//Biotechnology. – 1996. – 14. – P. 1107–11.
38. Prevost P., Flori S. Application of AN 69 hydrogel to islet encapsulation. Evaluation in streptozotocin-induced diabetic rat model // Ann. NY Acad. Sc. – 1997. – 831(1). – P. 344–9.
39. Rayat G.R., Rajotte R.V., Korbitt G.S. Potential application of neonatal porcine islets as treatment for type 1 diabetes: a review // Ann NY Acad. SCI. – 1999. – 875. – P. 75–188.
40. Rogers S.A., Chen F., Talcott M. et al. Glucose tolerance normalization following transplantation of pig pancreatic primordia into non-immunosuppressed diabetic ZDF rats//Transpl. Immunol. – 2006. – 16 (3–4). – P. 176–84.
41. Stevens R.B., Matsumoto S., Marsh C.L. Is islet transplantation a realistic therapy for the treatment of type 1 diabetes in the near future // Clinical Diabetes. – 2001. – 19. – P. 51–60.
42. Todo S., Fung J.J. Liver, kidney and thoracic organ transplantation under FK506 // Ann. Surg. – 1990. – 212. – P. 295–305.

Издание 2-е, переработанное и дополненное

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ



Готовится к печати
Издательская группа РОНЦ

УДК 347.779:608.3

*Н.А.В. Киселев, Г.А. Гордина, И.Ю. Кубасова, С.А. Зорина, О.И. Тарасова***РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОФОРМЛЕНИЮ ЗАЯВОК
НА РЕЗУЛЬТАТЫ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ**
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**Контактная информация:***Киселев Александр Владимирович, доктор медицинских наук, заведующий патентно-лицензионным отделением***адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., 24; **тел.:** +7(495)324-14-69, **факс:** +7(499)612-78-05**e-mail:** patent@ronc.ru

Статья поступила: 20.01.2009, принята к печати 01.04.2010.

Резюме

В статье представлены рекомендации по оформлению заявок на изобретения, сделан акцент на результатах интеллектуальной деятельности в области медицины. Особо подчеркивается тот факт, что в России можно получить патент почти на любой продукт или способ, относящийся к здравоохранению. Указываются причины, побуждающие медицинских сотрудников патентовать свои разработки. Подчеркивается, что количество патентов является показателем уровня инновационной деятельности организации. Перечислены объекты интеллектуальной деятельности, охраняемые в Российской Федерации, и те объекты, которые не могут иметь патентных прав. Для иллюстрации раскрытия изобретений приведены примеры различных объектов изобретений в области медицины (онкологии).

Ключевые слова: результаты интеллектуальной деятельности, изобретение, патент, патентоспособность, лицензия.

*A.V. Kiselev., G.A., Gordina., I.Y. Kubasova, S.A. Zorina., O.I. Tarasova***RECOMMENDATIONS FOR DRAWING UP A CLAIM
FOR THE RESULTS OF INTELLECTUAL ACTIVITY**

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow

Abstract

Recommendations for drawing up a claim for an invention are presented in the article with an accent on the results of intellectual activity in the medical area. The fact that in Russia one can get a patent on almost any product or method related to healthcare is especially underlined. The reasons motivating scientific workers to claim for a patent are indicated. It is accentuated that the number of patents is an index of a innovative level in the given organization. The objects of intellectual activity which are protected in the Russian Federation as well as those that can not be under such a protection are enumerated. In order to illustrate an invention prototype, the tasks of an invention and the technical result the examples of different objects of inventions in the medical area are given.

Key words: results of intellectual activity, invention, patent, patentability, licence.

Введение

В XXI век – время развития инновационных технологий во всех отраслях деятельности, в том числе и в здравоохранении. С изменениями экономической ситуации в России происходит становление рынка медицинских услуг и технологий, осуществляется передача технологий по лицензиям. Либерализация российской патентной системы позволяет расширить круг патентуемых объектов, для каждого из которых необходимо представить тот или иной объем доказательств, подтверждающих соответствие условиям патентоспособности.

Россия является одной из немногих стран, где можно получить патент на любой продукт или способ, относящийся к здравоохранению [1]. Более чем за 10-летний период работы в условиях реформированного патентного законодательства в Федеральном институте промышленной собственности (ФИПС) накоплен опыт экспертизы заявок на результаты интеллектуальной деятельности (РИД) медицинского назначения.

Причины, побуждающие медиков и медицинские учреждения патентовать свои разработки:

- стремление иметь документ, подтвер-

ждающий приоритет разработки и учитываемый при защите кандидатских и докторских диссертаций;

- количество патентов является показателем уровня инновационной деятельности организации, одним из критериев эффективности ее работы;
- моральный фактор, т.е. желание быть признанным автором изобретения [2].

Не всякий изобретатель может четко сформулировать суть своего новшества и правильно его описать в соответствии с установленным законодательством требованиями.

Патентовед поможет квалифицированно составить заявку на изобретение, подготовить описание и формулу изобретения, познакомить с дальнейшей процедурой охраны и защиты новшества.

Охраняемые РИД в РФ:

- изобретения;
- промышленные образцы;
- полезные модели;
- товарные знаки;
- программы для ЭВМ;
- топологии интегральных микросхем;
- секреты производства (ноу-хау) и др.

Условия патентоспособности изобретения:

Изобретение – это техническое решение задачи в любой области знания, в том числе в здравоохранении, относящееся к продукту или способу, которое является:

- новым, т.е. неизвестным из уровня техники;
- имеет изобретательский уровень, т.е. для специалиста явным образом не следует из уровня техники (уровень техники – любые сведения, ставшие общедоступными в мире до даты приоритета изобретения);
- промышленно применимым, т.е. может быть использовано в промышленности, здравоохранении и т.д.

Объектом изобретения может являться продукт или способ.

1. Объект изобретения – продукт.

Продуктом как объектом изобретения является, в частности, устройство, вещество, штамм микроорганизма, культура (линия) клеток растений и животных, генетическая конструкция:

- устройство (конструкция или изделие);
- вещество (химические соединения, в том числе нуклеиновые кислоты и белки; фармакологические композиции – составы и смеси; продукты ядерного превращения);
- штамм микроорганизмов (штаммы бактерий, вирусов, бактериофагов, микроводорослей, микроскопических грибов, консорциумы микроорганизмов);
- культура (линия) клеток растений или животных (линии клеток тканей, органов растений или животных, консорциумы соответствующих клеток);
- генетическая конструкция (плазмиды, векторы, стабильно трансформированные клетки микроорганизмов, растений и животных, трансгенные растения и животные).

2. Объект изобретения – способ.

Способом как объектом изобретения является процесс осуществления действий над материальным объектом с помощью материальных средств.

Способ может быть охарактеризован в виде применения продукта или способа по определенному назначению.

Предложения, которым **не предоставляется** правовая охрана согласно ГК РФ, и которые **не могут** быть объектами патентных прав:

- способы клонирования человека;
- способы модификации генетической целостности клеток зародышевой линии человека;
- использование человеческих эмбрионов в промышленных и коммерческих целях; иные решения, противоречащие общественным интересам, принципам гуманности и морали.

Изобретениями не являются:

- открытия;
- научные теории и математические методы;
- решения, касающиеся только внешнего вида изделий и направленные на удовлетворение эстетических потребностей;
- правила и методы игр, интеллектуальной или хозяйственной деятельности;
- решения, заключающиеся только в представлении информации.

Не предоставляется правовая охрана в качестве изобретения:

- сортам растений, породам животных и биологическим способам их получения, за исключением микробиологических способов и продуктов, полученных такими способами;
- топологиям интегральных микросхем.

Состав заявки на выдачу патента на изобретение

Заявка на выдачу патента на изобретение подается в федеральный орган исполнительной власти по интеллектуальной собственности (Роспатент) и должна содержать:

1. Заявление о выдаче патента с указанием автора изобретения и лица, на имя которого испрашивается патент (заявителя), а также их места жительства или места нахождения.
2. Описание изобретения, раскрывающее его с полнотой, достаточной для осуществления.
3. Формулу изобретения, выражающую его сущность и полностью основанную на его описании.
4. Чертежи и иные материалы, если они необходимы для понимания сущности изобретения.
5. Реферат.

Заявление о выдаче патента представляется на типографском бланке или в виде компьютерной распечатки (заполняется патентно-лицензионным отделением, в нашей организации патентно-лицензионным отделением РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН).

Документы, прилагаемые к заявке на изобретение:

1. Документ об уплате патентной пошлины в установленном размере, или документ, подтверждающий основания освобождения от уплаты патентной пошлины, либо уменьшения ее размера, либо отсрочки ее уплаты (оформляются патентно-лицензионным отделением РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН).
2. К заявке на изобретение, относящееся к штамму микроорганизма, линии клеток растений или животных, либо к средству с использованием неизвестных штаммов микроорганизма или линии клеток, содержащей указание на их депонирование в уполномоченной на это коллекции микроорганизмов, прилагается документ о депонировании (оформляется авторами заявки).
3. К заявке, содержащей перечень последовательностей нуклеотидов и/или аминокислот, прилагается машиночитаемый носитель информации с записью копии того же перечня последовательностей и подписанное заявителем заявление относительно того, что информация, представляемая в машиночитаемой форме, идентична перечню последовательностей, представляемому в печатной форме (оформляется авторами заявки).

Описание изобретения должно раскрывать изобретение с полнотой, достаточной для его осуществления.

Структура описания изобретения:

1. Название изобретения (с указанием объекта изобретения).
2. Область техники, к которой относится изобретение (к медицине).
3. Уровень техники (сведения об известных автору аналогах изобретения, совпадающих по назначению; их недостатки; ссылки на источники информации).
4. Выбор и описание наиболее близкого к изобретению аналога (прототипа) того же назначения.

5. Указываются известные заявителю причины, препятствующие получению технического результата, который обеспечивается изобретением.
6. Задача, на решение которой направлено изобретение с указанием обеспечивающего им технического результата.
7. Технический результат – эффект, полученный при осуществлении изобретения. Технический результат в медицине может выражаться, например, в улучшении качества жизни, увеличении продолжительности жизни, снижении частоты осложнений, повышении трудовой, медицинской реабилитации, снижении рецидивов, сокращении продолжительности стационарного лечения, повышении эффективности лечения, улучшении и достоверности диагностики.
8. Раскрытие изобретения – сведения, раскрывающие сущность изобретения, т.е. признаков, достаточных для достижения изобретением технического результата.
9. Краткое описание чертежей с перечнем фигур и пояснениями того, что изображено на каждом из них.
10. Примеры или другие сведения, демонстрирующие осуществление изобретения.
11. Формула изобретения определяет объем правовой охраны и представляет собой совокупность существенных признаков, т.е. признаков, необходимых и достаточных для достижения указанного заявителем технического результата. Формула изобретения состоит из ограничительной части, включающей признаки изобретения, совпадающие с признаками прототипа, и отличительной части, включающей признаки, отличающие изобретение от прототипа.
12. Реферат – сокращенное изложение содержания описания изобретения, включающее название, характеристику области техники, к которой относится изобретение, характеристику сущности изобретения и достигаемого технического результата [1].

В медицине изобретения традиционно относятся к трем основным группам объектов:

- изделия медицинской техники и технологии их производства;
- лекарственные средства и технологические процессы их создания;
- способы профилактики, диагностики, лечения и прогнозирования заболеваний. [4; 5].

Примеры раскрытия изобретений в медицине (онкологии):

Пример 1.

Объект: способ удаления опухоли правого надпочечника абдоминальным доступом.

Прототип: способ удаления опухоли правого надпочечника, недостатком которого является высокая травматичность, связанная с особенностями доступа в двух анатомических областях, что увеличивает риск развития интра- и послеоперационных осложнений, включая осложнения при вскрытии плевральной полости.

Задача: разработка способа удаления опухолей правого надпочечника, обеспечивающего возможность удаления не только малых опухолей надпочечника, но и опухолей более 6 см в диаметре и снижающего риск интра- и послеоперационных осложнений.

Технический результат: снижение травматичности за счет вскрытия одной анатомической области, снижение риска угрожающего жизни кровотечения и послеоперационных осложнений, сокращение времени операции и сроков пребывания в стационаре.

Пример 2.

Объект: способ ультразвуковой диагностики метастатического поражения регионарных лимфатических узлов.

Прототип: способ ультразвуковой диагностики метастатического поражения лимфатических узлов, не позволяющий выявить структуру отдельных лимфатических узлов и выявить метастазы размерами менее 5–7 мм, т.е. низкая информативность метода раннего метастатического поражения лимфатических узлов.

Задача: разработка способа ультразвуковой диагностики метастатического поражения регионарных лимфатических узлов, позволяющего осуществить раннюю диагностику метастатического поражения регионарных лимфатических узлов при различных онкологических заболеваниях.

Технический результат: обнаружение мелких метастазов (от 1,7 мм в диаметре), обеспечение наибольшей эффективности лечения вследствие своевременного проведения адекватной терапии.

Пример 3.

Объект: устройство – резекционный съемный протез верхней челюсти для устранения обширных дефектов мягких тканей и костных структур лицевого скелета у оперированных больных при частичной резекции верхней челюсти.

Прототип: протез для закрытия твердого неба после полной резекции верхней челюсти, недостатками которого являются чрезмерная объемность конструкции, травматичность мягких тканей, трудности, возникающие при надевании и снятии протеза, отсутствие полной герметичности между полостью рта и полостью носа.

Задача: создание резекционного съемного протеза верхней челюсти, позволяющего полностью устранить указанные недостатки.

Технический результат: простота и удобство использования протеза пациентом, используемая на силиконовой основе композиция эластична и нетравматична, обеспечивает полную герметичность между полостью рта и носа, простота изготовления протеза.

Пример 4.

Объект: клеточная линия А 4 Т-лимфобластного лейкоза человека, используемая для скрининга противоопухолевых препаратов.

Прототип: клеточная линия Т-лимфобластного лейкоза человека, которая имеет воспроизводимый иммунофенотип Т-лимфобластного лейкоза и экспрессирует трансмембранный рецептор сигнала клеточной смерти CD95 (Fas/APO-1).

Задача: создание модельной клеточной линии, дефицитной по экспрессии рецептора сигнала клеточной смерти CD95 для расширенного поиска и скрининга веществ с потенциальной противоопухолевой активностью.

Технический результат: клеточная линия А 4 Т-лимфобластного лейкоза человека, обладающая иммунофенотипом множественной лекарственной и радиорезистентности, что позволяет использовать ее для одновременного расширенного скрининга и первичного отбора синтетических и природных веществ с потенциальной противоопухолевой активностью и тестировать препараты, противоопухолевая активность которых не связана с индукцией апоптоза опухолевых клеток.

Пример 5.

Объект: противоопухолевое средство.

Прототип: известная лекарственная форма противоопухолевого препарата нестабильна, требует непосредственного внутривенного введения после добавления воды для инъекций, токсична.

Задача: сохранение противоопухолевой активности лекарственного средства, получение водорастворимой инъекционной лекарственной формы для пролонгированного внутривенного введения, снижение побочных эффектов.

Технический результат: заявляемое лекарственное средство является высокоэффективным для широкого спектра злокачественных опухолей, водорастворимо, обладает стабильностью и безопасностью, что позволяет его рекомендовать в виде внутривенных капельных введений.

Датой приоритета изобретения является дата поступления заявки в Роспатент. После этого автор вправе раскрывать сведения, касающиеся изобретения (например, в открытой печати) [1].

Изобретение признается патентоспособным, если заявка на изобретение подана в федеральный орган исполнительной власти по интеллектуальной собственности не позднее 6 мес. со дня раскрытия информации об изобретении (публикация в открытой печати, открытое использование, демонстрация на выставке) – авторская льгота [3].

В Роспатенте проводится экспертиза заявки:

- формальная экспертиза (наличие всех перечисленных выше правильно оформленных документов);
- экспертиза по существу (информационный поиск и проверка соответствия заявленного изобретения условиям патентоспособности) [1].

Сведения о заявке на изобретение, прошедшей формальную экспертизу с положительным результатом, после 18 мес. со дня подачи заявки публикуют в официальном бюллетене.

Если в результате экспертизы по существу установлено, что изобретение соответствует критериям патентоспособности, Роспатент принимает решение о выдаче патента, на основании чего изобретение вносится в Государственный реестр РФ и на него выдается патент.

Патент на изобретение действует в течение 20 лет, считая со дня приоритета.

Срок действия патента на лекарственные средства может продлеваться не более чем на 5 лет [3]. Интеллектуальная собственность охраняется законом [3]. На РИД признаются интеллектуальные права, которые включают исключительное право, являющееся имущественным правом, а также личные неимущественные права.

Интеллектуальные права на изобретения, промышленные образцы и полезные модели являются патентными правами.

Автору изобретения, полезной модели и промышленного образца принадлежат следующие права:

- исключительное право;
- право авторства;
- право на получение патента;
- право на вознаграждение и др.

Автором изобретения, полезной модели или промышленного образца признается лицо, творческим трудом которого создан соответствующий РИД. Соавторами признаются лица, совместно создавшие изобретение, полезную модель, промышленный образец. Взаимоотношения лиц, которым исключительное право принадлежит совместно, определяются соглашением между ними.

Литература

1. Административный регламент исполнения Федеральной службой по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам Государственной функции по организации приема заявок на изобретение и их рассмотрения, экспертизы и выдачи в установленном порядке патентов Российской Федерации на изобретение от 29 октября 2008 N327. (www.rospatent.com или www1.fips.ru) или М.: Патент, 2009. – 132 с.
2. *Белый Ю.А., Терещенко А.В., Юдина Ю.А.* Медицинские изобретения. Шаги к экономическому использованию // Научно-практическая конференция «Правовая охрана интеллектуальной собственности в условиях проведения административной реформы и вступления в силу части четвертой гражданского кодекса Российской Федерации», Тезисы докладов, Москва, октябрь 2007г. – С. 38–41.
3. Гражданский кодекс Российской Федерации (ГК РФ). Часть 4, от 18.12.2006. – N 230 – ФЗ.
4. *Уткина Е., Москвитина О.* К вопросу о патентовании объектов медицинского назначения, использующих нанотехнологии // Интеллектуальная собственность. Промышленная собственность. – 2008. – № 2. – С. 30–7.
5. *Шахматова Т.Б., Тимонин А.Н.* Инновационная деятельность и медицина/Патенты и лицензии. – 2005. – № 3. – С. 46–9.

Доходы от совместного использования РИД распределяются поровну между соавторами, если соглашением между ними не предусмотрено иное.

Изобретение, созданное работником в связи с выполнением трудовых обязанностей, признается служебным изобретением. Право авторства на служебное изобретение и другие РИД принадлежит работнику (автору). Исключительное право на служебное изобретение и другие РИД и право на получение патента принадлежит работодателю – правообладателю (если договором между работником и работодателем не предусмотрено иное).

Правообладатель может распоряжаться РИД следующим образом:

1. Заключать договор об отчуждении исключительного права (уступка патента): одна сторона – патентообладатель (лицензиар) передает принадлежащее ей исключительное право на соответствующий РИД в полном объеме другой стороне – приобретателю патента (лицензиату).
2. Заключать лицензионный договор на использование РИД: одна сторона, патентообладатель (лицензиар), предоставляет другой стороне (лицензиату) удостоверенное патентом право использовать изобретение, полезную модель, промышленный образец, программу ЭВМ, базу данных, топологию интегральных микросхем в установленных договором пределах.

Лицензионный договор может быть в виде:

- исключительной лицензии;
- неисключительной лицензии.

Договор об отчуждении патента, лицензионный договор, а также другие договоры заключаются в письменной форме и подлежат государственной регистрации в федеральном органе исполнительной власти по интеллектуальной собственности.

Заключение

Положительные тенденции в развитии экономической ситуации в Российской Федерации не могут не влиять на становление рынка медицинских услуг и технологий, а либерализация российской патентной системы позволяет значительно расширить перечень патентуемых объектов. В настоящее время не случайно ставится вопрос об оценке деятельности организации по количеству патентуемых результатов интеллектуальной деятельности. Предлагаемые рекомендации по оформлению заявок на изобретения ставят своей целью помочь, особенно начинающим изобретателям, квалифицированно составить заявку на изобретение, подготовить описание и формулу изобретения, познакомиться с дальнейшей процедурой охраны новшества.

ТЕЗИСЫ

1. КЛИНИЧЕСКАЯ ОНКОЛОГИЯ

Т.А. Абдылдаев¹, С.Ш. Найзабекова¹, С.М. Адекенов²
**АРГЛАБИН
 В КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ
 МЕСТНОРАСПРОСТРАНЁННОГО РАКА
 ШЕЙКИ МАТКИ**

¹Национальный центр онкологии МЗ Кыргызской Республики, г. Бишкек

²Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», Казахстан, г. Караганда

Цель исследования. Изучить эффективность нового противоопухолевого препарата арглабин в сочетании с другими цитостатиками при местнораспространённом РШМ.

Материалы и методы исследования. В исследование были включены 32 больных РШМ IIб-IIIб стадии, получавших лечение в отделении химиотерапии Национального центра онкологии МЗ Кыргызской Республики с октября 2009 по февраль 2010 г. Ранее больным не проводилось предшествующего лечения (ХТ, ЛТ). Арглабин применяли в оптимальной дозе 5 мг/кг перед введением ХТ. Последняя проводилась в режиме 5-фторурацил 500 мг/м² в/в с 1 по 4 день; цисплатин в дозе 75 мг/м² в/в капельно на 5 день с гидратацией. Проведено 2–3 курса ПХТ. 10 пациенток получили 1 курс химиотерапии с арглабином, 14 больных – 2 курса, 8 больных – 3 курса с арглабином. Эффективность лечения оценивалась по стандартным критериям ВОЗ.

Результаты. Изучение непосредственных результатов клинического эффекта в исследуемой группе показало: полная регрессия опухоли у 1 из 32 больных (3,2%), частичная регрессия опухоли достигнута у 16 (50%) больных, у 15 (46,8%) – отмечена стабилизация процесса. Общая эффективность (полная, частичная регрессия) составила 53,2%. Токсичность проведенного режима химиотерапии с арглабином была умеренной. Ни у одной больной не отмечено ФН. Гематологическая токсичность I–II степени наблюдалась у 6 женщин (18,7%).

Выводы. Изученный режим химиотерапии с включением арглабина оказался эффективным, частота общего эффекта составила 53,2%.

Ю.А. Белый¹, А.В. Терещенко¹, А.В. Шацких²
**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ
 ВОЗМОЖНОСТЕЙ ПОВЫШЕНИЯ
 ЭФФЕКТИВНОСТИ
 ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ЛИЗИСА
 В ОФТАЛЬМООНКОЛОГИИ**

¹Калужский филиал ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова Росмедтехнологии», г. Калуга;

²ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова Росмедтехнологии», г. Москва

Цель – изучение влияния интратуморального введения раствора NaCl различных концентраций на эффективность электрохимического лизиса (ЭХЛ) при больших внутриглазных новообразованиях.

Материалы и методы. ЭХЛ проводили на 6 све-

жеэнуклеированных глазах с опухолями больших размеров: проминенция – > 9 мм, ширина основания: 16–19 мм. В 2 случаях до и через каждую минуту после начала ЭХЛ добавляли 0,9 %-ный р-р NaCl; в 2–10 %-ный, в 2 – 26 %-ный. ЭХЛ выполняли на аппарате «ECU-300» («Soring», Германия) с силой тока 20 мА в течение 10 мин, использовали 2 электрода, катод и анод.

Проведены гистологические исследования с количественным анализом зон электрохимического повреждения опухоли.

Результаты. Наибольшим разрушениям опухоль подвергалась в области постановки катода. Отмечено полное разрушение клеток, с нитевидными структурами, представляющими собой истонченные волокна стромы опухоли и стенки разрушенных сосудов.

В зоне воздействия анода опухоль теряла свою компактность в строении, появлялись щелевидные пространства между клетками, а сами клетки меняли форму и структуру ядра. В зоне перекрещивания воздействий катода и анода разрушение опухоли проявлялось образованием полостей с бесклеточным миксоидным компонентом. Количественный анализ гистологических препаратов показал, что площадь поврежденной опухолевой ткани при применении 26 %-ного солевого раствора в 2,5–3 раза превышала таковую в случаях с 10 %-ным солевым раствором и в 6–7 раз – в случаях с 0,9 %-ным.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о перспективности применения насыщенного солевого раствора NaCl для повышения эффективности ЭХЛ внутриглазных новообразований.

Ю.А. Белый, А.В. Терещенко, Н.Н. Юдина
**ПРИМЕНЕНИЕ АНТИVEGF-ФАКТОРОВ
 В КОМБИНИРОВАННОМ ЛЕЧЕНИИ
 МЕЛАНОМ ХОРИОИДЕИ**

Калужский филиал ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова Росмедтехнологии», г. Калуга

Цель – оценка клинической эффективности фотодинамической терапии в сочетании с интравитреальным введением антиVEGF-факторов в лечении хориоидальной меланомы.

Материалы и методы. Под наблюдением находились 3 пациента (3 глаза) с меланомами хориоидеи (МХ) средних размеров преэкуatorialной локализации. По данным В-сканирования размеры основания не превышала 8,5×6,6 мм, высота проминенции – до 4,0 мм. По данным цветового и энергетического доплеровского картирования (ЦДК и ЭДК) тип кровоснабжения опухоли во всех случаях соответствовал гиперваскулярному. Острота зрения при поступлении составляла в 2 случаях 0,2 и в 1 – 0,4.

Всем пациентам проводили транспупиллярную фотодинамическую терапию с хлориновым ФС – бис-N-метилглюкаминовой солью хлорина е6. Через одни сутки и через один месяц после ФДТ проводилось интравитреальное введение препарата ранибизумаб в дозе 0,5 мг. Срок наблюдения – до 1,5 лет.

Результаты. Через 6 месяцев во всех случаях отмечалась практически полная регрессия МХ с формированием на месте опухоли слегка проминирующего фиброзного очага с незначительной неравномерной пигментацией.

По данным серошального В-сканирования отмечено значительное уменьшение высоты опухоли (0,4–0,8 мм). Данные ЦДК и ЭДК свидетельствовали об отсутствии внутриопухолевого кровотока (аваскулярный очаг).

Следует отметить сохранение относительно высоко-го центрального зрения (в 2 случаях 0,1 и в 1 – 0,2 мм) после лечения.

Результаты прослежены в течение 18 мес., признаков рецидива новообразования ни в одном случае не отмечено.

Заключение. Сочетание ФДТ и интравитреально-го введения антиVEGF-факторов позволяет достичь полной регрессии МХ с сохранением функциональных показателей и отсутствием рецидивов в сроки наблюдения до 1,5 лет.

*И.А. Балдуева, Т.Л. Нехаева, А.В. Новик,
О.Л. Фахрутдинова, А.Б. Данилова, А.О. Данилов,
Е.В. Зуева, В.М. Моисеенко*

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА В ELISPOT-ТЕСТЕ У БОЛЬНЫХ

С ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ
ФГУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова Росмедтех-
нологий», С-Петербург

Задачи исследования. Изучение продукции IFN- γ опухоль-специфическими Т-лимфоцитами в ELISPOT-тесте у больных с диссеминированной МК в процессе вакцинотерапии аутологичными ДК.

Материалы и методы. В исследование включено 40 образцов МНПК 5 больных с диссеминированной МК, получавших вакцинотерапию на основе аутологичных ДК, и 4 контрольных образца МНПК, полученных от здоровых лиц. Использовали стандартные IFN- γ ELISPOT тест-системы и ростовые факторы Т-клеток (IL-7, IL-12) в различных сочетаниях.

Мишенями для активации специфических Т-клеток в ELISPOT-тесте был коктейль из 4 аллогенных клеточных линий меланомы (Mel 226, Mel 263, Mel 253, Mel 515), экспрессирующих рга (NY-ESO-1, MAGE, HAGE, GAGE), и их лизат, который также использовался для нагрузки вакцинных ДК и соответствовал иммунофенотипу аутологичной опухоли.

Результаты. Продукция IFN- γ опухоль-специфическими Т-клетками была зарегистрирована в ELISPOT-тесте в присутствии аллогенных клеточных линий меланомы и их лизата:

1. у 3 из 5 больных после 1 введения вакцины (от 3 до 8 IFN- γ -продуцирующих клеток из 105 МНПК);
2. у 4 из 5 – после 2 вакцинации (10–30 IFN- γ -продуцирующих клеток из 105 МНПК);
3. у 5 из 5 – после 3 вакцинации (12–40 IFN- γ -продуцирующих клеток из 105 МНПК) как в сочетании с IL-7, так и в сочетании IL-7+IL-12.

У здоровых лиц и больных до вакцинотерапии IFN- γ -продуцирующие клетки не выявлялись.

Медиана продукции IFN- γ поствакцинальными опухоль-специфическими Т-клетками в присутствии аллогенных клеточных линий меланомы в сочетании с IL-7 и IL-7 + IL-12, составили $5,7 \times 10^5$ МНПК и $34,15 \times 10^5$ МНПК; в присутствии лизата клеточных линий – $0,5 \times 10^5$ МНПК и $15,05 \times 10^5$ МНПК соответственно. Различия были статистически достоверны в парном тесте Wilcoxon ($p \leq 0,003$).

*Н.В. Бочкова³, В.Б. Сирота¹, А.Х. Досаханов²,
Е.В. Кострова³, Н.Л. Целикова³*

ВЛИЯНИЕ АРГЛАБИНА НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПИЩЕВОДА ПОСЛЕ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ

¹Карагандинский государственный медицинский университет, Караганда, Казахстан

²Национальный научный медицинский центр МЗ РК, Астана, Казахстан

³КГКП «Областной онкологический диспансер», Караганда, Казахстан

Задачи исследования. изучение влияния арглабина на выживаемость больных РП при ЛТ.

Материалы и методы исследования. Проанализированы результаты лечения 79 больных РП.

Средний возраст – 63,9 лет, с III стадией рака – (71,4 \pm 6,5)%. Из них 30 получали ЛТ классическим фракционированием дозы: по 2 Гр один раз в день, 5 раз в неделю до СОД 60-62 Гр (группа контроля). 49 больных получали ЛТ динамическим фракционированием дозы (ДФ): первые 3 дня РОД – 4,0 Гр.

Далее методом мультифракционирования: РОД – 1,2 Гр \times 2 раза в день с интервалом в 4,5 часа до СОД, изозффективной 64-68 Гр классического фракционирования.

Пациенты основной группы методом слепой рандомизации разделены на две подгруппы. Из них 14 больных получали только ЛТ ДФ (I подгруппа).

На фоне ЛТ 35 больным основной группы (II подгруппа) перед сеансом вводили внутривенно 20 дней арглабин из расчёта 370 мг/м².

Суммарная доза варьировала от 8000 до 14000 мг. Определяли функцию выживания в программе Statistica 5.5 и общую наблюдаемую выживаемость по E. Kaplan–P. Meier.

Результаты. Одногодичная общая наблюдаемая выживаемость больных раком пищевода основной группы по методу Kaplan–Meier составила 82 %, 2-летняя – 70 %, 3-летняя – 50 %. В группе контроля 1-годичная выживаемость составила 85 %, 2-летняя – 56 %, 3-летняя – 36 %.

Функция выживания в основной группе 1 год равна (99,0 \pm 0,01) %, на 2 год снижается до (69,8 \pm 0,12) %, на 3 год – до (41,2 \pm 0,17) %.

В контрольной группе:

1 год опускалась до (84,9 \pm 0,09) %;

2 год до (55,9 \pm 0,15) %;

3 год до (35,6 \pm 0,15) % ($p \leq 0,001$).

В I подгруппе больных функция выживания 1 год варьировала от (96,4 \pm 0,05) % до (75,8 \pm 0,14) %, 2 год – (45,2 \pm 0,17) %, 3 год – (26,4 \pm 0,14) %.

В II подгруппе больных функция выживания на первый год имеет показатель от (97,7 \pm 0,03) % до (86,9 \pm 0,09) %, 2 год – (65,2 \pm 0,17) %, 3 год – (35,7 \pm 0,21) %.

Во II подгруппе больных, получавших ЛТ ДФ дозы с арглабином, функция выживания на первый и второй годы жизни выше на 20%, на третий год – на 9,3% по сравнению с таковой у больных I подгруппы, получавших ЛТ ДФ дозы без арглабина.

Выводы. Применение арглабина в комбинации с ЛТ ДФ дозы повышает показатели выживаемости больных раком пищевода, данные статистически значимы ($p \leq 0,001$).

Обнаружение опухоли специфических Т-клеток в ELISPOT-тесте и их рост в процессе вакцинотерапии аутологичными ДК, нагруженными опухолевым лизатом, у больных с диссеминированной МК, может рассматриваться как суррогатный маркер специфического поствакцинального иммунного ответа.

¹Бычков М.Б., ¹Горбунова В.А., ¹Гарин А.М.,
²Борисов В.И., ³Гершанович М.Л., ¹Трецалина Е.М.,
⁴Небольсин В.Е.

ДИКАРБАМИН В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

¹РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН, Москва

²ГУЗ ОКД №1 Департамента Здравоохранения Москвы,

³ФГУ НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова Росмедтехнологий, С.–Петербург

⁴ОАО «Валента Фармацевтика», Москва

Введение. Нейтропения является одним из наиболее грозных осложнений миелосупрессивной ПХТ онкологических больных и развивается в 35–52% случаев при раке яичников, молочной железы и легкого, лимфомах. При развившейся нейтропении применяются колоние-стимулирующие факторы, которые нельзя использовать с профилактической целью или на фоне введения цитостатиков. Среди отечественных препаратов для предупреждения нейтропении используется цитокин беталейкин, который не свободен от выраженных побочных эффектов. В 2009 г. в практику вошел новый гематопротектор дикарбамин (Dcg), который применен пациентам с солидными опухолями и гемобластозами при проведении полихимиотерапии. Результаты исследования представлены в настоящем сообщении.

Материал и методы. В исследование включены 138 пациентов, в том числе 92 больных РЯ и 46 пациентов с ЛГМ и НХЛ с исходно нормальными или низкими показателями кроветворения. Было проведено 495 циклов лечения с Dcg и использованием стандартных схем ХТ, вызывающих лейко- и нейтропению III и IV ст. в 40–60% случаев. Dcg применялся в стандартной схеме: за 5 дней до начала первого цикла ХТ и на фоне всего лечения ежедневно в разовой дозе 100 мг на больного. Оценка гематокоррекции проведена по стандартным показателям: частоте, глубине и длительности осложнения, срокам восстановления показателей кроветворения, отсрочке последующих циклов ПХТ, а также необходимости снижения доз препаратов в сравнении с ПХТ без дикарбамина.

Результаты. Применение дикарбамина при ПХТ больных раком яичников с исходно нормальными показателями позволило достоверно снизить частоту лейкопении в 1,7–2,7 раза по числу курсов лечения; уменьшить частоту нейтропении по числу больных в 1,9 раза (24%) против 45,8%, $p < 0,045$) и по числу курсов в 2,6 раза (14,9 против 38,9%, $p < 0,023$). Отсрочка лечения на 7 дней отмечалась в 1,8 раз реже (38 против 66%, $p < 0,033$) а 15% больных с исходно низкими показателями кроветворения Dcg позволил выполнить ПХТ в полных дозах. У 82% больных ЛГМ, получавших схему АВВД, Dcg позволил предупредить лейкопению и гранулоцитопению III и IV ст. и провести лечение при 100 %-ной миелодепрессии в предыдущих циклах лечения. У 7 из 8 больных НХЛ, получавших схемы СНОР или СНОЕР, на фоне Dcg число случаев нейтропении IV степени уменьшилось в 2 раза.

Заключение. Дикарбамин при пероральном приеме по 100 мг эффективно предупреждает лейко/нейтропению после миелосупрессивной ПХТ более чем у 50% больных РЯ при исходно нормальных показателях кроветворения за счет уменьшения частоты лейко/нейтропении III+IV в 1,7–2,7 раза. У 82% больных ЛГМ, получающих лечение по схеме АВВД с миелодепрессией в предыдущем цикле, особенно при лейко/гранулоцитопении III и IV ст. дикарбамин позволяет провести следующий курс ХТ в запланированных дозах. У большинства больных с неходжкинскими лимфомами ПХТ по схемам СНОР или СНОЕР с дикарбамином не вызывает фебрильной нейтропении и уменьшает число осложнений IV степени в 2 раза.

П.М. Бычковский¹, Т.Л. Юркинович¹, С.А. Беляев¹,
 Д.А. Адамчик¹, Ф.Н. Капуцкий¹, Э.А. Жаврид²,
 А.В. Ваккер², Ю.Г. Шанько³, Е.А. Короткевич³

«ЦИСПЛАЦЕЛ» – НОВЫЙ ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ЛОКАЛЬНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ В ОБЛАСТИ ГОЛОВЫ И ШЕИ

¹Учреждение БГУ «НИИ физико-химических проблем», Минск

²ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», Минск

³ГУ «РНПЦ неврологии и нейрохирургии» МЗ РБ, Минск

В представленной работе исследован процесс иммобилизации на биodeградируемом полимере – ОЦ ЦП, одного из наиболее эффективных противоопухолевых препаратов для системной и внутриаартериальной химиотерапии злокачественных новообразований. В результате был разработан способ получения лекарственного препарата «Цисплацел», заключающийся в иммобилизации ЦП окисленной целлюлозой посредством ионообменного взаимодействия из водного раствора цитостатика с концентрацией, не превышающей 8×10^{-3} моль/л. Установлено, что релиз ЦП из фазы полимера в физиологический раствор протекает в две стадии. Причем, на начальной стадии вблизи пораженного органа создается ударная доза цитостатика, а на протяжении конечной происходит постепенная “подпитка” пораженного органа небольшим количеством лекарственного вещества, что создает эффект пролонгированного действия.

В условиях *in vitro* была проведена оценка цитостатического эффекта препарата «Цисплацел» на модели клеточной культуры HeLa. Результаты проведенных исследований показали, что препарат обладает цитостатическим эффектом, и особенно важно, что он по своей выраженности не только не уступает действию чистого цисплатина, но и превосходит его. Нейротоксическое действие препарата было исследовано *in vivo* на двух однородных группах по 10 животных. Установлено, что «Цисплацел» не обладает значительным повреждающим действием на интактную ткань головного мозга, даже в условиях релиза цитостатического препарата в спинномозговую жидкость.

Клинические испытания препарата «Цисплацел» были проведены на 45 больных с различными новообразованиями головы и шеи. В результате местного применения «Цисплацела» после не радикальных удалений первичных (17) и рецидивных (28) новообразований различной локализации на голове и шее, в настоящее время здоровы 23 человека (51%), а рецидивы возникли у 22 (49%). При его использовании частота рецидивов уменьшилась в среднем на 25–40% по сравнению с контрольной группой больных в зависимости от локализации опухоли, что свидетельствует об эффективности местного применения препарата «Цисплацел». Медиана выживаемости больных, которым была проведена локальная ХТ с препаратом «Цисплацел» составила 433 дня, что в 2 раза превышало этот показатель при стандартном комбинированном лечении (214 дней). При применении лекарственного препарата «Цисплацел» 7 больных пережили 1 год после операции, в контрольной группе – только 2 больных.

В результате проведенных клинических испытаний установлено: эффективность препарата «Цисплацел» в качестве противоопухолевого средства послеоперационной локальной ХТ супратенториальных глиом ГМ оценивается положительно; достоверное увеличение продолжительности БРВ с $31,9 \pm 2,8$ нед до $50,8 \pm 3,2$.

Кумулятивная выживаемость, рассчитанная по таблицам продолжительности жизни (*Life table method*) в основной группе, была выше, чем в контрольной, что также свидетельствует о большей эффективности полученного препарата, в сравнении с нативным цисплатином.

Лекарственный препарат «Цисплацел» зарегистрирован на территории Республики Беларусь (регистрационное удостоверение №09/09/1667 от 30.09.2009 года) и рекомендован к применению в медицинской практике в качестве лекарственного средства для имплантации в ложе удаленной супратенториальной нейрорезектальной опухоли головного мозга, а также в мягкие ткани и полости в месте удаленной опухоли органов головы и шеи с целью обеспечения локального цитостатического противоопухолевого воздействия.

Л.Ю. Владимирова, И.Л. Попова

ОТЕЧЕСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ МАВЕРЕКС В ЛЕЧЕНИИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ РНИОИ, Ростов-на-Дону

Задача исследования. Оценка эффективности маверекса отечественного производства при лечении метастатического РМЖ и связанной с ним токсичности.

В исследование вошли 45 пациенток с генерализацией РМЖ, находившихся на лечении в РНИОИ в 2009 г., в возрасте от 30 до 70 лет (средний возраст – 47,9 года). У всех имелись множественные висцеральные метастазы: в печень у 51% (23), легкие и плевру – у 80% (36), в мягкие ткани – у 20% (9), в кости – у 55% (25). Из них у 28% (13) пациенток было локализованное поражение легких и плевры, у 62% (32) – сочетание нескольких очагов метастазирования. Необходимо отметить, что маверекс применялся в качестве 3 и последующей линий терапии «отчаяния» генерализованного РМЖ, в основном – при прогрессировании заболевания на антрациклинах и/или таксанах. Препарат вводился в дозе 30 мг/м² 1 раз в неделю в монорежиме у 17% (8) пациенток; в сочетании с кселодой – в 55% (25), с гемзаром – в 8% (4), 5-ФУ – в 8% (4), с VP-16 – в 8% (4) случаях. Проводили 3–6 курсов (ch/4,5) ХТ, терапию продолжали до достижения максимального эффекта или прогрессирования, а также прекращали в связи с негативными проявлениями. Эффект на проведенное лечение в виде улучшения и стабилизации процесса был зарегистрирован в 75% (34) наблюдений; прогрессирование на фоне лечения – в 25% (11). Препарат больные переносили относительно удовлетворительно, анализы крови сдавали перед каждым введением маверекса. Осложнения: преобладала гематологическая токсичность, лейко/нейтропения II и III степени зарегистрированы в 34% случаев (70 из 202 курсов). Из негематологических осложнений, связанных непосредственно с маверексом, отметили развитие после 2 и более курсов лечения флебитов в 26% наблюдений (12 из 45). Приведенные данные свидетельствуют о достаточно высокой эффективности и хорошей переносимости отечественного маверекса при лечении генерализаций РМЖ.

Л.Ю. Владимирова, Н.А. Абрамова

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ И ТОКСИЧНОСТИ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПАКЛИТАКСЕЛА В ЛЕЧЕНИИ МЕТАСТАТИЧЕСКОГО РМЖ РНИОИ, Ростов-на-Дону

Задача исследования. Оценка эффективности паклитаксела-ЛЭНС (Верофарм, Россия) при лечении метастатического РМЖ и связанной с паклитакселом токсичности.

В исследование вошли 44 пациентки с метастатическим РМЖ, находившиеся на лечении в РНИОИ в 2009 г., в возрасте от 39 до 65 лет (средний возраст 53,9 года). Из них 5 имели первично генерализованный процесс, у 39 пациенток отмечена генерализация процесса после радикального комбинированного и комплексного лечения. У всех женщин имелись множественные висцеральные метастазы: в печень – 59% (26), легкие и плевру у 61,3% (27), яичники – 8,25% (3), надпочечники и щитовидную железу – по 2,3% (1), сочетающиеся с метастазами в отдаленные лимфоузлы в 50% (22) и кости в 63,6% (28). Паклитаксел применялся в качестве 1 линии терапии метастатического РМЖ у 35 женщин, в качестве второй – у 9, после антрациклин-содержащих режимов. Препарат вводился в дозе 175 мг/м² 1 раз в 3 недели на фоне стандартной премедикации и необходимой сопроводительной терапии в сочетании с антрациклинами в 27,3% (12), митоксантроном в 27,3% (12), винорельбином в 20,4% (9), карбоплатином в 4,5% (2), фторурацилом в 11,4% (5), в монорежиме – в 9,1% (4) случаях. Проводили от 3 до 8 курсов ХТ, в среднем – 3,6; терапию продолжали до достижения максимального эффекта, прогрессирования или прекращали в связи с негативными проявлениями.

Объективный ответ на лечение в виде частичной ремиссии был зарегистрирован в 45,5% (20) наблюдений, стабилизация процесса в 38,6% (17), прогрессирование на фоне лечения в 15,9% (7). Из осложнений химиотерапии преобладала гематологическая токсичность, лейкопения и нейтропения III и IV степени зарегистрированы в 28,3% случаев (45 из 159 курсов), фебрильная нейтропения – в 5,6% (9 из 159). При выраженной нейтропении производилось снижение дозы паклитаксела на 25% в последующих курсах. Из негематологических осложнений, связанных непосредственно с паклитакселом, следует отметить развитие после 2 и более курсов лечения периферической нейропатии II в 38,6% наблюдений (17 из 44) и III степени в 4,5% (2). 1 пациентке лечение паклитакселом было прекращено из-за проявлений нейропатии.

Приведенные данные свидетельствуют о высокой эффективности и хорошей переносимости паклитаксела-ЛЭНС при лечении метастатического РМЖ.

Л.Ю. Владимирова, Козлова Т.И., Н.А. Абрамова **ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТАУТАКСА В ЛЕЧЕНИИ МЕТАСТАТИЧЕСКОГО РМЖ** РНИОИ, Ростов-на-Дону

Задача исследования. Оценка эффективности Таутакса при лечении метастатического РМЖ и связанной с паклитакселом токсичности.

В исследование вошли 26 пациентки с метастатическим РМЖ, находившиеся на лечении в РНИОИ в 2009 г., в возрасте от 40 до 60 лет (средний возраст – 54,1 года). Из них 8 (30,8%) имели первично генерализованный процесс, у 18 (69,2%) пациенток отмечена генерализация процесса после радикального комбинированного и комплексного лечения.

У всех больных имелись множественные метастазы: висцеральные в печень, легкие и плевру, метастазы в отдаленные лимфоузлы и кости. Таутакс вводился в дозе 75 мг/м² 1 раз в 3 недели на фоне стандартной премедикации и необходимой сопроводительной терапии в сочетании с антрациклинами (доксорубин по 50 мг/м², эпирубицин по 70 мг/м²). Проводили от 3 до 6 курсов химиотерапии, в среднем 4, терапию продолжали до достижения максимального эффекта, прогрессирования или прекращали в связи с негативными проявлениями.

Объективный ответ на лечение в виде частичной ремиссии был зарегистрирован в 19,2% (5) наблюдений, стабилизация процесса в 69,2% (18), прогрессирование на фоне лечения в 11,5% (3). Из осложнений химиотерапии преобладала гематологическая токсичность, лейкопения и нейтропения 3 и 4 степени зарегистрированы в 6,4% случаев (5 из 78 курсов). При выраженной нейтропении производилось снижение дозы Таутакса на 25% в последующих курсах. Из негематологических осложнений отмечены миалгии и оссеалгии, периферическая нейропатия II степени после 2 и более курсов лечения.

Приведенные данные свидетельствуют о высокой эффективности и хорошей переносимости Таутакса при лечении метастатического РМЖ.

Л.Ю. Владимирова, Н.А. Лейман

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ И ОКСИЧНОСТИ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ОКСАЛИПЛАТИНА (ЭКЗОРУМ) В ЛЕЧЕНИИ РЖ И КРР РНИОИ, Ростов-на-Дону

Задача исследования: оценить эффективность Экзорума ("Vegorham") при лечении рака.

В исследование вошли 15 пациентов, страдавших КРР и РЖ, находившихся на лечении в РНИОИ в 2009 г., в возрасте от 30 до 75 лет (средний возраст 52,5 года). Из них 7 имели первично-генерализованный процесс, у 5 пациенток отмечена генерализация процесса после радикального комбинированного и комплексного лечения, а 3 пациента получали послеоперационную ПХТ по поводу местнораспространенного КРР. У 12 больных имелись множественные висцеральные метастазы: в печень – у 50% (6), легкие – у 16,6% (2), яичники – у 25% (3), сочетающиеся с метастазами в забрюшинные лимфоузлы в 25% (3), большой сальник в 25% (3), прорастанием в чревный ствол в 16,6% (2) и метастазами по брюшине с асцитом в 16,6% (2) случаев. Экзорум вводился в дозе 100 мг/м² 1 раз в 3 недели на фоне необходимой сопроводительной терапии в сочетании с 5-фторурацилом и лейковорином в 93,3% (14), кселодой в 6,7% (1) случаях. Продолжали от 1 до 8 курсов ХТ, в среднем 3,3. Терапию продолжали до достижения максимального эффекта или прогрессирования, а также прекращали в случае негативных проявлений. Было проведено 50 курсов ПХТ с Экзорумом.

Результаты: объективный ответ на лечение в виде ЧР зарегистрирован в 66% случаев (10 случаев), стабилизация – в 20% (3), прогрессирование на фоне лечения – в 13% (2). Введение химиопрепаратов больные переносили относительно удовлетворительно. Из осложнений преобладала негематологическая токсичность: тошнота I степени в 4% случаев (2 курса), тошнота II степени – в 12% (6 курсов), диарея II степени в 2% (1 курс), головная боль в 6% (3 курса), полинейропатия в 8% (4 курса), анемия I степени – в 2% случаев (1 из 50 курсов). В 74% (37 курсов) патологических реакций не было.

Приведенные данные свидетельствуют о высокой эффективности и хорошей переносимости отечественного оксалиплатина при лечении РЖ и КРР.

И.Г. Гатауллин, А.В. Жинов, С.В. Петров, С.В. Городнов

ИЗМЕНЕНИЕ ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКОГО ФЕНОТИПА РПК ПОД ВЛИЯНИЕМ ЛТ С РАДИОМОДИФИКАЦИЕЙ ВИХРЕВЫМИ МАГНИТНЫМИ ПОЛЯМИ КОД МЗ РТ, г. Казань; Ульяновский областной онкологический диспансер, г. Ульяновск

Актуальность. Отдаленные результаты хирургического метода лечения больных РПК за последние 20

лет практически не изменились. Дальнейший прогресс в этом направлении следует связывать с мерами, обеспечивающими максимальное подавление агрессивности опухоли до начала оперативного вмешательства, что должно предотвратить лимфогематогенную диссеминацию. Это положение является научной основой концепции комбинированного метода лечения с неoadьювантным компонентом.

Материалы и методы. В основу работы положены данные о лечении 123 больных РПК I–III стадии, которые были разделены на две группы:

1. 64 пациента – выполнены радикальные операции;
2. 59 пациентов – получали неoadьювантное лечение по двум схемам:
 - 30: предоперационная ЛТ средними фракциями;
 - 29: предоперационная ЛТ+магнитотерапия как радиомодифицирующий фактор.

Иммуногистохимические исследования проведены с помощью набора МКАТ к Ki-67, bcl-2, к РЭА, к Е-кадгерину, к CD68 (маркеру гистиоцитов/макрофагов), к p21, к антигену CD45RO, к CD95/Fas.

Результаты. При анализе широкого спектра биомаркеров РПК отмечен высокий уровень экспрессии РЭА, маркера клеточной пролиферации Ki-67. Отмечена слабо- и умеренно положительная экспрессия CD68 и инфильтрация Т-лимфоцитами во всех случаях. Слабоположительная экспрессия p21 в половине наблюдений. Слабо положительная экспрессия Е-кадгерина в 33,3%. Отрицательная реакция на bcl-2 и CD95 во всех наблюдениях. Применение предоперационной ЛТ с радиомодификацией вихревыми магнитными полями изменяет иммуноморфологический фенотип РПК, проявляющийся в снижении пролиферации (Ki-67 слабая активность в 100%), уменьшение экспрессии p21 (отрицательная реакция в 100% случаев), усиление дифференцировки опухоли (Е-кадгерин – экспрессия в 88,9% случаев), и повышение внутритканевого иммунитета (Т-клеточная инфильтрация в 88,9% случаев).

Выводы. Предоперационная лучевая терапия средними фракциями до СОД 25 Гр в сочетании с радиомодификацией вихревыми магнитными полями оказывает выраженное тумороцидное воздействие на структуру опухоли.

Это проявляется в снижении пролиферативной активности, усилении дифференцировки и Т-клеточной инфильтрации опухоли. Логично предположить, что данные изменения отразятся на результатах лечения больных РПК.

Е.А. Дудко¹, Н.И. Троянова², Р.Ю. Рамануйскайте¹, Т.А. Бозуш¹, А.А. Каменский²

ТАМОКСИФЕН КАК ИНГИБИТОР ПРОТЕИНКИНАЗЫ

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

²МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет.

Цель исследования. К настоящему моменту тамоксифен (ТАМ) – селективный модулятор эстрогеновых рецепторов – остаётся одним из важнейших препаратов в терапии и профилактике РМЖ.

Кроме того, он проявляет ряд других клинически важных эффектов, воздействуя на различные белки, участвующие во внутриклеточной сигнализации, в частности, на протеинкиназу с РКС.

В литературе описаны случаи эффективности лечения злокачественных опухолей ГМ при применении высоких доз тамоксифена и достижении в крови концентраций, в которых он способен ингибировать *in vitro* активность РКС, поскольку прямое цитотоксическое действие тамоксифена на опухоль исключено.

Его эффективность в этом случае связывают с возможным ингибирующим воздействием на РКС, которая является ключевым регулятором процессов роста опухоли ГМ и клинически значимым маркером прогноза течения заболевания. Влияние РКС на процессы пролиферации и апоптоза зависит от того, какая именно изоформа фермента активна в опухоли, при этом *in vitro* показана способность ТАМ модулировать активность большинства, если не всех, изоформ РКС. Однако механизм этого воздействия до сих пор остаётся неясным.

Мы предположили, что инактивация РКС происходит за счёт непосредственного связывания с ферментом молекулы ТАМ. В настоящей работе исследована возможность взаимодействия ТАМ с РКСdelta

Материалы и методы. Работа проведена методом иммунофлуоресценции с использованием проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии на культуре клеток НМРЛ человека линии А549, фиксированных 4 %-ным формальдегидом. Использованы АТ фирмы Абсам: первичные моноклональные – IgG кролика против человеческой РКСdelta (ab52763), вторичные поликлональные – козий IgG, конъюгированный с FITC, против кроличьего IgG (ab6108); изотипический контроль – кроличий IgG (ab37415). Важно отметить, что эпитоп анти-РКСdelta антител располагается вблизи С-конца молекулы, в месте локализации каталитического домена. Время инкубации как с первичными, так и со вторичными антителами составляло 1,5 часа. Среднее значение флуоресценции клеток определяли с помощью программы WinMDI, процент окрашенных клеток – статистическим методом Колмогорова-Смирнова.

Результаты.

1. Экспрессия РКСdelta выявлена приблизительно в 70 % клеток А549.
2. Методом проточной цитофлуориметрии показано, что предварительная инкубация с ТАМ снижает интенсивность специфической флуоресценции и число специфически флуоресцирующих клеток при окрашивании моноклональными антителами к РКСdelta в 1,5 и более раз.
3. При визуализации окраски клеток с помощью флуоресцентного микроскопа получены сходные результаты: отмечено снижение числа интенсивно флуоресцирующих клеток при их окрашивании моноклональными антителами к РКСdelta после воздействия ТАМ.
4. При использовании обоих методов не выявлено влияния ТАМ на неспецифическое (изотипическое) окрашивание клеток и интенсивность автофлуоресценции.

Выводы. Снижение интенсивности флуоресценции клеток при воздействии ТАМ свидетельствует об уменьшении доступности каталитического домена РКС для антител, что может являться следствием изменения пространственной структуры фермента под действием препарата. Поскольку в фиксированных клетках отсутствует внутриклеточная сигнализация, и возможны только энергонезависимые взаимодействия молекул, по-видимому, происходит прямое взаимодействие ТАМ с молекулой РКС, которое и приводит к изменению конформации. Этот факт согласуется с литературными данными о существовании в каталитическом домене РКС специфических сайтов связывания трифенилэтиленов, к которым относятся и ТАМ. Изменение формы молекулы, в свою очередь, может модулировать ее ферментативную активность. Изменение же активности РКС за счет непосредственного связывания с ней ТАМ может являться одним из механизмов клинической эффективности данного антиэстрогена при лечении опухолей ГМ, в которых РКС является ключевым регулятором клеточного роста.

Поддержано РФФИ (Грант № 09-04-13560).

С.В. Зинченко², Р.Ш. Хасанов¹

ЛЕЧЕНИЕ БОЛЬНЫХ С МЕТАСТАЗАМИ МЕЛАНОМЫ БЕЗ ВЫЯВЛЕННОГО ПЕРВИЧНОГО ОЧАГА

¹Приволжский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН РФ, Казань

²РКОД МЗ РТ, Казань

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ историй болезни и амбулаторных карт 581 больных с метастазами меланомы без выявленного ПО, обследованных и получивших лечение в РКОД МЗ РТ с 1996 по 2008 г.

У 36 пациентов (6,2%) на основании морфологического исследования метастазов диагностирована меланома. Из них 22 (61,1%) мужчины, 14 (38,9%) женщины. Пациенты находились в возрасте от 28 до 74 лет, средний возраст пациентов составил 52,0±2,05 лет.

Результаты и обсуждение. Из 36 случаев диагностированной меланомы первичная опухоль была идентифицирована лишь у 5 пациентов. У всех пациентов метастаз меланомы был доказан с помощью иммуногистохимического метода.

Согласно классификации TNM-2002, у 22 пациентов метастазы меланомы были расценены как регионарные (N), у 14 как отдаленные (M).

Первичный очаг в дальнейшем выявлен у 5 пациентов: в 2 случаях отмечалась спонтанная регрессия опухоли (в одном полная), в 3 случаях меланома была беспиgmentной, что затрудняло визуализацию.

Только хирургическое лечение было выполнено пациентам с регионарными метастазами в объеме подмышечной лимфодиссекции 2–3 степеней радикальности (у 2 пациентов двухсторонняя); шейной лимфодиссекции 1–5 уровней и пахово-подвздошной лимфаденэктомии (операция Дюкена Мельникова).

У 19 пациентов хирургическое лечение было дополнено иммунотерапией (3 млн. ЕД интерферона через день не менее 6 мес.). Пациентам, имевшим органное распространение метастазов, была проведена монокимioterapia дакарбазином 2–6 курсов.

Таблица
Выживаемость пациентов с метастазами меланомы без выявленного первичного очага

Группы пациентов	№	Выживаемость, %			
		1 год	3 года	5 лет	5 лет (ESMO, 2009) ¹
III стадия	22	95,5	54,5	18,2	15-18,4 (p=0,042)
IV стадия	14	50,0	21,4	7,1	2,5-6,0 (p=0,078)
Всего	36				

Выводы:

1. На долю пациентов с метастазами меланомы без выявленного первично очага приходится 6,2 %.
2. Иммуногистохимическое исследование играет ведущую роль в морфологической идентификации опухоли у данной категории пациентов.
3. Стадирование при диагностированных метастазах меланомы целесообразно проводить согласно классификации TNM-2002, при этом данные выживаемости сопоставимы с результатами, полученными у пациентов с известным первичным очагом.
4. Отсутствие первичного очага при метастазах меланомы не является неблагоприятным фактором.

В.М. Моисеенко

ИНДИВИДУАЛИЗАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

ФГУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова Росмедтехнологий», кафедра онкологии ГОУ ДПО «Санкт-Петербургской МА ПО» Росздрава

В последнее десятилетие отмечается значительный прогресс в лекарственном лечении злокачественных опухолей. Вместе с тем остаются нерешенными ряд важнейших проблем, одна из которых – эмпирический выбор терапии. Необходимость индивидуализации лекарственного лечения злокачественных опухолей обусловлена ограниченной эффективностью противоопухолевых препаратов (20-50 %), высокой частотой побочных токсических эффектов, высокой «ценой» ошибочного выбора (эффективность II линии ниже таковой I), неуклонным ростом стоимости лекарственного лечения (1980 – 100 долл./мес.; 2000 – до 30 000 долл./мес.).

Доминирующий в настоящее время эмпирический выбор терапии основывается на вероятностных показателях эффективности (публикации, стандарты), клинических данных (особенности течения заболевания: индолентное или агрессивное) и интуиции врача. Очевидно, что такой подход неизбежно сопровождается высокой частотой ошибочного выбора терапии для конкретного больного и значительными экономическими потерями для государства.

Наиболее перспективными представляются молекулярно-генетические маркеры, которые могут характеризовать индивидуальные особенности опухоли у конкретного пациента. В клинической практике в качестве стандарта уже используется определение уровня HER2, рецепторов стероидных гормонов для выбора терапии при РМЖ, CD20 – при НХЛ, c-kit – при гастроинтестинальных стромальных опухолях. Применение этих маркеров позволяет сузить круг лиц, подлежащих дорогостоящему лечению, и повысить его эффективность. При этом, однако, важно, что эти маркеры не обладают 100 %-ной прогностической значимостью.

Поиски новых предиктивных и прогностических молекулярно-генетических особенностей опухолей позволили выявить большую группу маркеров, которые апробируются при KPP (DPD, TS, TP, UGT1A1, K-ras, B-RAF), РЛ (ERCC1, мутации EGFR), РМЖ и РЯ (BRCA1, топоизомераза II). Наиболее перспективными в настоящее время представляются определение мутации EGFR при раке легкого и мутации BRCA1 при опухолях молочной железы и яичников. Выявление подобных молекулярных нарушений (20% – больных аденокарциномой легкого) позволяет получить выраженный лечебный эффект в 60–80 % случаев при использовании дорогостоящих ингибиторов тирозинкиназы (гефитиниб, эрлотиниб), что в 3 раза превышает эффективность высокотоксичной стандартной ХТ. Выявление же мутации BRCA1 у больных РМЖ и РЯ (5–7 % случаев) позволяет с помощью монотерапии цисплатином достичь значимого регресса опухоли в 80–100 % наблюдений, что также в несколько раз превышает эффективность стандартного лечения.

Несомненным прорывом в лечении больных меланомой кожи является выявление B-RAF- мутаций и синтез специфических ингибиторов этого пути сигнальной трансдукции. Как показывают результаты исследований I-II фазы, их эффективность может достигать 60-70 %. Несколько менее значимыми, но практически целесообразными представляются также другие маркеры и их комбинации.

Чрезвычайно перспективным является также изучение метромного использования цитостатических

препаратов с конечной целью увеличения выживаемости путем стабилизации процесса. Предклинические и клинические данные свидетельствуют о целесообразности такого подхода.

Таким образом, определение молекулярно-генетических особенностей опухоли является перспективным направлением клинической онкологии, так как позволяет повысить его эффективность в силу индивидуализации и обладает несомненным экономическим эффектом.

Проданец Н.Н., Снопина Л.Б., Загайнова Е.В., Стрельцова О.С., Орлова А.Г.

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ И ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ РАННЕГО РМП

НГМА, Н. Новгород, ИПФ РАН, Н. Новгород

Цель исследования. Изучение неэкзофитных флюоресцирующих зон в стенке мочевого пузыря с использованием молекулярно-биологических маркеров, флюоресцентной цистоскопии и ОКТ. Иммуногистохимическое исследование проведено стрептавидин-биотин-пероксидазным методом по общепринятой схеме с использованием МКА к белкам: Ki-67 – маркер пролиферации, p-53 – супрессор опухолевого роста, цитокератину 20 и антигенам группы крови ABO(H). Использован биопсийный материал от пациентов с неинвазивными формами рака мочевого пузыря – T_a, T₁ (неэкзофитные флюоресцирующие зоны, опухоли). Гистологически в изучаемых зонах слизистой оболочки мочевого пузыря выявлена морфологическая картина воспаления.

Умеренная пролиферативная активность Ki-67 и патологический тип экспрессии цитокератина 20 отмечались как в неэкзофитных флюоресцирующих зонах, так и в опухоли. Однако у 25% пациентов в неэкзофитных флюоресцирующих зонах наблюдался нормальный тип экспрессии цитокератина 20. Экспрессия p-53 составила 41 %, в – опухолях 56%. Потеря антигенов групп крови ABO(H), характерная для переходноклеточных раков, показана нами для 50% опухолей. В неэкзофитных флюоресцирующих зонах преобладало позитивное окрашивание на данные антигены. Из 163 плоских флюоресцирующих зон 150 были доброкачественными по данным гистологии и, следовательно, имели ложноположительную флюоресценцию.

По данным ОКТ 79% неэкзофитных флюоресцирующих зон были верно распознаны как доброкачественные. Таким образом, комбинированное использование в диагностике флюоресцентной цистоскопии, ОКТ и молекулярно-биологических маркеров, несомненно, улучшают качество диагностики рака мочевого пузыря. В то же время, характер и уровень экспрессии изученных маркеров указывает на вероятность появления неопластических нарушений в неэкзофитных флюоресцирующих зонах, что должно вызывать настороженность при обследовании больного и более обоснованно выбирать тактику лечения.

А.Н. Рудык, С.В. Зинченко, Р.Ш. Хасанов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ С МЕТАСТАЗАМИ

ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА В ЛИМФАТИЧЕСКИЕ УЗЛЫ ШЕИ БЕЗ ВЫЯВЛЕННОГО ПЕРВИЧНОГО ОЧАГА

РКОД МЗ РТ, г. Казань

Приволжский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина

Задачи исследования. На долю пациентов с метастазами в лимфатические узлы шеи приходится до 30% всех больных с метастазами злокачественных опухолей без выявленного первичного очага.

Диагностическая и лечебная тактика для этой группы пациентов остается нерешенной проблемой.

Материалы и методы. Произведен анализ медицинской документации 66 пациентов с метастазами плоскоклеточного рака в лимфатические узлы шеи без выявленного первичного очага.

Результаты и выводы. Отмечено расхождение между первичным цитологическим заключением и последующим гистологическим у 16 (34%) из 47 пациентов. Первичный очаг выявляется у 39,4% пациентов в среднем спустя 7 мес. от момента обращения. Наилучшие показатели демонстрируют пациенты, получившие комплексное лечение и комбинацию ЛТ и ПХТ, одно- и трехлетняя выживаемость составляет 91,7 и 64,8% соответственно после комплексного и 87,5 и 72,9% после химиолучевого лечения при средней продолжительности жизни 44,6 и 29,9 мес.

В. Б. Сирота¹, Г. О. Олжатаева², С. Х. Искакова²

ВЛИЯНИЕ АРГЛАБИНА

НА РЕЗУЛЬТАТЫ ЛТ

РАКА СЛИЗИСТОЙ ПОЛОСТИ РТА

¹КГМУ, Караганда, Казахстан

²КГКП ООД, Караганда, Казахстан

Задачи исследования: повышение эффективности ЛТ рака слизистой полости рта путем комбинации ЛТ с арглабином в качестве радиомодификации.

Материалы и методы. В 2006–2008 гг. в ООД пролечено 38 больных раком слизистой полости рта и глотки. Всем пациентам проведена ЛТ классическим фракционированием дозы: по 2 Гр один раз в день, 5 раз в неделю до СОД 60–62 Гр. Первая группа (16) больных – только ЛТ. Вторая группа (22) больных на фоне ЛТ перед сеансом вводили в/в 2% раствор арглабина по 370 мг/м² до СД 8000–14000 мг. Средний возраст больных составил 56,8 года. В первой группе запущенный опухолевый процесс имели 14 больных (87,5%), во второй – 17 больных (77,3%). Плоскоклеточный рак без ороговения наблюдали у (42,1±8,0)%, плоскоклеточный рак с ороговением – в (36,8±7,8)% случаев.

Эффективность комбинированного лечения оценивали по стандартным критериям ВОЗ (1978) с использованием клинического, ультразвукового и эндоскопического методов. Оценка гематологической токсичности проводили согласно рекомендациям ВОЗ.

Полученные результаты и обсуждение. Полный регресс опухоли наблюдали в группе больных, получавших на фоне ЛТ арглабин, у (31,8±9,9)% пациентов; в группе больных, получавших ЛТ без арглабина, – у (12,5±8,3)% ($p>0,05$). Частичный ответ опухоли: в группе больных с арглабином – у (50,0±10,7)% пациентов, в группе без арглабина – у (18,8±9,8)% ($p\leq 0,05$). У (68,8±11,6)% больных, получавших ЛТ без арглабина, стабилизация опухолевого процесса. В группе больных, получавших лучевую терапию в комбинации с арглабином, частичный ответ получен в 2,6 раза чаще, чем в группе пациентов, получавших лучевую терапию без арглабина. При использовании арглабина при ЛТ не наблюдали анемии и агранулоцитоза. В то время как при ЛТ без арглабина гематологические изменения проявились более рельефно: анемия в 12,6±8,3% случаев, лейкопения – в 31,2±11,6%, агранулоцитоз – в 12,5±4,6% случаев. Тромбопения не отмечена ни в одной из групп.

Выводы. Наблюдается общая положительная динамика ЛТ у больных раком слизистой полости рта и глотки, получавших ЛТ с арглабином. Необходимо отметить положительную субъективную оценку состояния больных при введении арглабина, что способствует улучшению качества жизни данных пациентов.

В.В. Слугарев, С.В. Гамаюнов, А.Н. Денисенко, И.С. Шумская, С.Р. Пахомов, А.А. Артифкесова, С.С. Кузнецов, Н.М. Шахова

МОТИВАЦИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ХТ

В ЛЕЧЕНИЕ ОПЕРАБЕЛЬНОГО РЖ

ГУЗ НООД

ГОУ ВПО НГМА

Цель исследования. Оценить целесообразность комплексного лечения операбельного рака желудка распространенных стадий.

Материалы и методы. Основанием для настоящего исследования послужили клинические наблюдения за 96 больными в возрасте от 33 до 77 лет с морфологически верифицированным диагнозом «рак желудка». Из них 39 пациентов в раннем послеоперационном периоде получили курс эндолимфатической ПХТ (два введения по схеме эпозид 100 мг, фторурацил 750 мг) и 6 курсов системной полихимиотерапии по схеме ELF, остальные получали только хирургическое лечение. Группы были сопоставимы по основным показателям. В обеих преобладали распространенные стадии заболевания (IIA–IV – 80%).

Результаты. Запланированное лечение полностью завершили 90% пациентов (36/40 случаев). Местные осложнения эндолимфатической ПХТ составили 17%, системная токсичность – 15% без проявления токсичности III–IV ст. Системная токсичность III–IV ст при проведении курсов внутривенной ПХТ составила 8%. В группе комплексного лечения отмечено увеличение медианы ОБ на 16,7±5,0 мес., БРВ ($P=0,049$, разница медианы составила 17,7±7,19 мес.), снижение частоты внутрибрюшинных рецидивов в первые два года наблюдения на 22±18,2% ($P<0,05$).

Выводы. Проведение эндолимфатической терапии может быть начато в ранние сроки после выполнения оперативного компонента лечения, что не увеличивает частоту и тяжесть послеоперационных осложнений и не оказывает негативного влияния на течение послеоперационного периода. Разработанная методика комплексного лечения отличается безопасностью и хорошей переносимостью. Полученные результаты БРВ и частоты внутрибрюшинных рецидивов в первые два года наблюдения свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения предложенной методики.

В.А. Тронов¹, Д.Н. Артамонов², М.Е. Абрамов³, Л.Б. Горбачева²

ОТВЕТ ЛИМФОЦИТОВ

КРОВИ БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ НА ХТ.

КОРРЕЛЯЦИЯ

С КЛИНИЧЕСКИМ ОТВЕТОМ ПАЦИЕНТОВ

¹ИХФ им. Н.Н.Семенова РАН, Москва

²ИБФ им. Н.М.Эммануэля РАН, Москва

³РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва

Задачи исследования. Меланома, высоко агрессивное неопластическое заболевание, поддается лечению на начальных стадиях. По мере прогрессии заболевания эффективность лечения снижается. Ведущее место среди терапевтических процедур, применяемых при меланоме, занимает цитотоксическая ХТ. Монофункциональные алкилирующие агенты (дакарбазин, прокарбазин) и нитрозомочевины (кармустин и ломустин) лежат в основе распространенных терапевтических протоколов лечения меланомы. Частота положительного ответа больных не превышает 20%. Два исследовательские стратегии направлены на преодоления низкой эффективности химиотерапии: разработка новых терапевтических подходов и поиск маркеров, позволяющих прогнозировать индивидуальную устойчивость/чувствительность больных к ХТ.

Цель работы. Оценка возможности использовать повреждение ДНК, репарацию (BER и MMR), экспрессию рецепторного проапоптотического белка FasR и двух белков, участвующих в репарации ДНК (MLH1 и MSH2) как прогностические факторы комбинированной ХТ больных меланомой LDCI.

Материалы и методы. Параметры измеряли в лимфоцитах крови пациентов до и после 1 цикла ХТ и определяли их корреляцию с ответом больных после двух циклов ХТ LDCI: ломустин – 80 мг/м², *p.o.*, 1 день; дакарбазин – 250 мг/м², в/в, 1–3 дни; цисплатин – 80 мг/м², в/в, 3 день; ингарон – 5 мЕд, в/м, 3 дн/нед, 3 нед. Повреждение ДНК в лимфоцитах определяли с помощью метода ДНК-комет; эффективность MMR оценивали по формированию вторичных двуниевых разрывов в ДНК в ответ на тест-воздействие метилнитрозомочевинной *in vitro*; эффективность BER определяли по формированию одонитевых разрывов на фоне ингибирующего действия метоксиамины; экспрессию белков определяли иммуноцитохимически; долю погибших клеток оценивали как долю спонтанно пермеабилезованных клеток, выпелливающих нуклеоид.

Результаты. Показано, что АП-сайты и одонитевые разрывы являются основным типом поврежденных ДНК в ответ на ХТ. Несмотря на межиндивидуальную вариабельность эффективности BER, повреждения одонитевой ДНК полностью удалялись спустя 30 дней после первого курса. Обнаружена корреляция между уровнем двуниевых разрывов ДНК в лимфоцитах после первого курса химиотерапии и эффективностью MMR в них ($R^2=0,89$, $p<0,0001$). Уровень вторичных двуниевых разрывов ДНК в лимфоцитах после первого терапевтического цикла коррелировал с эффективностью химиотерапии.

Выводы. Высокий уровень двойных разрывов ДНК в лимфоцитах больных, формирующихся в течение 24–48 ч после 1 цикла коррелирует с благоприятной динамикой заболевания. Повреждения на уровне одонитевой ДНК (АП-сайты и одонитевые разрывы) и эффективность BER не могут прогнозировать клинический ответ на LDCI-протокол ХТ.

Фрадкин В. Г.

ОПЫТ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НУКЛЕОСПЕРМАТ НАТРИЯ В ГУЗ МООД ГУЗ МООД, Москва

Введение. В ГУЗ МООД использование препарата Нуклеоспермат натрия проводится с 2005 г. у больных со злокачественными новообразованиями различных локализаций, получающих лекарственное, комбинированное или комплексное лечение. Известно, что препарат активизирует процессы пролиферации, миграции и дифференцировки нейтрофильных гранулоцитов, эритроцитов, тромбоцитов и лимфоцитов. Кроме того, лекарственное средство активизирует и повышает содержание клеток-киллеров CD4⁺, стимулирует антителообразование, что обуславливает резкое усиление иммунного ответа и оказывает положительное влияние на течение раневого процесса после обширных хирургических вмешательств, обладает дезинтоксикационным эффектом.

Цель исследования. Оценка гемостимулирующего эффекта препарата и действия на иммунный статус пациентов. Оценка возможности его профилактического применения для предотвращения развития нейтропении у пациентов, получающих ХТ и/или ЛТ.

Материалы и методы. Препарат применяли у 20 пациентов отд. общей радиологии с разными диагнозами. Проводили ЛТ в комбинации с разными режимами ХТ.

Нуклеоспермат натрия применяли в дозировке 75 мг/день в течение 3–10 дней и в максимальной суточной дозировке 150 мг у некоторых пациентов. Введение препарата проводили одновременно с продолжением химиолучевой терапии.

Результаты. Гемостимулирующий эффект отмечен у 18 пациентов (90%). Средний срок восстановления числа лейкоцитов составил от 4 до 9 дней. У большинства применение препарата купировало лейкопению, что дало возможность продолжить лечение по плану. Наиболее оптимальные результаты мы получили при введении препарата в дозе 75 мг в течение 5 дней. Отмечена положительная динамика течения раневого процесса у пациентов с обширными хирургическими вмешательствами, получающих комбинированное лечение. Введение препарата больные переносят удовлетворительно. Побочные эффекты были незначительны, проходили самостоятельно.

Выводы. Нуклеоспермат натрия показал высокую эффективность в профилактике нейтропении у пациентов, получающих комбинированное и комплексное лечение. Преимуществом средства является возможность его одновременного применения с курсами химиолучевой терапией. Наши данные позволяют рекомендовать препарат Нуклеоспермат натрия для профилактики и лечения нейтропении при проведении лучевой, химиолучевой терапии, а также для профилактики общих и местных реакций в период и после окончания комбинированного и комплексного лечения.

Чуксина Ю.Ю., Яздовский В.В., Катаева Е.В., Голенков А.К.

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ В-ХЛЛ В ПРОЦЕССЕ ТЕРАПИИ ГУ МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва

В рамках разработки и внедрения в практику противоопухолевых программ лечения, включающих новые препараты на основе МКАТ, был проведен иммунологический мониторинг группы пациентов (12 человек) с ранее установленным диагнозом В-ХЛЛ, получающих курс ХТ и препараты кэмпас или ритуксимаб методом 3-/4 цветной цитофлюориметрии.

В исследование были включены 12 пациентов с В-ХЛЛ. До начала терапии у всех была выявлена низкая экспрессия пан-В-клеточных антигенов, у части выявлено значительное увеличение CD25⁺/CD19⁺ лимфоцитов (в диапазоне 20,6–41,3%), увеличение числа лимфоцитов, экспрессирующих CD38⁺/CD19⁺ (среднее значение – 37,3%). Клиническую эффективность лечения больных ХЛЛ оценивали по критериям NCI (USA) как ПР, ЧР стабилизацию или прогрессирование.

При иммунофенотипировании лимфоцитов периферической крови с использованием 3-цветного цитометрического анализа (CD5/CD10/CD19; FMC7/CD23/CD19) через 7–9 нед. содержание опухолевого клона лимфоцитов составило от 0,27 до 2,5% (в среднем – 1,16%); содержание CD19⁺/CD38⁺ лимфоцитов ПК составило от 1,86 до 1,78% (в среднем 1,2%). При оценке состояния Т-клеточного иммунитета у данной группы пациентов было отмечено резкое снижение относительного и абсолютного количества Т-хелперных лимфоцитов CD3⁺CD4⁺ ниже 200 клеток в мл у 5 пациентов; у 5 – больных абсолютное содержание Т-хелперных, Т-цитотоксических лимфоцитов в процессе терапии находилось в пределах нормальных значений (от 1110 до 1480 кл/мл и от 204 до 393 кл/мл соответственно). У 1 пациента было выявлено увеличение содержания CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов в периферической крови, что на данном этапе лечения сопровождалось присоединением вирусной инфекции.

У одного пациента отмечалось резкое увеличение CD3⁺/CD4⁺-лимфоцитов (87–74 %), снижение числа CD3⁺/CD8⁺-лимфоцитов (26–17%), увеличение ИРИ.

Данные изменения сопровождались значительным (от 63 до 96%) увеличением количества активированных (CD3⁺HLA-DR⁺)-лимфоцитов, в то время как число CD4⁺/CD25⁺-лимфоцитов было низким (0,84–1,8%). У части пациентов при достижении ремиссии отмечалось увеличение минорной популяции T-NK-клеток (9,4±3,8%).

Чуксина Ю.Ю., Яздовский В.В., Катаева Е.В., Голенков А.К.
**ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ
 ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОЦИТОВ
 ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
 ПРИ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ
 ЗАБОЛЕВАНИЯХ**

ГУ МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва

Сегодня иммунофенотипирование пациентов с ЛПЗ представляет собой одно из наиболее востребованных клинических приложений ПЦ. Использование преимуществ многоцветного анализа позволяет проводить дифференциальную диагностику и мониторинг ЛПЗ в процессе лечения, оценивать прогноз заболевания.

Для диагностики и дифференциальной диагностики исследован фенотип лимфоцитов периферической крови и КМ методом 3/4-цветной лазерной ПЦ у 40 пациентов отделения гематологии МОНИКИ до начала лечения: интенсивность экспрессии пан-B-АГ (CD19, CD20, CD22, FMC7), CD10, CD5, T-клеточных АГ (CD2, CD7, CD3), маркеров активации (CD38, CD23, CD25). Выделение анализируемой популяции лимфоцитов проводилось методом селективного гейтирования по панлейкоцитарному антигену CD45 против SSC. B-клеточная клоналность устанавливалась при обнаружении рестрикции легких цепей поверхностных иммуноглобулинов. Степень выраженности экспрессии антигенов оценивалась по параметру средней интенсивности флуоресценции (MFI). Для B-XLLI характерна низкая экспрессия пан-B-АГ (CD19, CD20, CD22dim), CD23, CD5, отсутствие экспрессии CD10, FMC7. Обнаружение CD38⁺/CD19 лимфоцитов в диапазоне 21,09-35,7%-позитивных клеток коррелировало с неблагоприятным прогнозом. Для лимфом характерна высокая интенсивность коэкспрессии CD22⁺/CD20⁺, наличие FMC7⁺ клеток, отсутствие CD23. При лимфоме из клеток мантийной зоны выявлены экспрессия CD5, увеличение экспрессии активационных маркеров на CD19⁺ клетках (CD38⁺ и CD25⁺). При лимфоме из клеток маргинальной зоны селезенки отсутствовала экспрессия CD5⁺/CD19⁺, выявлена высокая (bright) интенсивность экспрессии CD22⁺/CD20⁺, CD20⁺, легких цепей иммуноглобулинов (κ), отсутствие CD25⁺/CD19⁺. При волосато-клеточном лейкозе выявлена коэкспрессия АГ CD103⁺/CD20⁺ (bright), CD103⁺/CD22⁺ (bright), CD19⁺/CD25⁺, высокий уровень экспрессии CD22⁺/CD20⁺, отсутствие CD5. Таким образом, оценка интенсивности экспрессии лимфоцитарных антигенов дает возможность провести дифференциальную диагностику ЛПЗ в сложных диагностических случаях и оценить их прогноз.

Шубина И.Ж., Титов К.С., Михайлова И.Н., Демидов Л.В., Киселевский М.В.

**ЛОКОРЕГИОНАРНАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ
 ОПУХОЛЕВЫХ СЕРОЗИТОВ
 РЕКОМБИНАНТНЫМ ИЛ-2 (Ронколейкин)
 РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**

Цель. оценка клинической эффективности и переносимости внутриплевральной моноиммунотерапии рекомбинантным ИЛ-2 (способен индуцировать дифференцировку лимфоцитов, часто содержащихся в плевральном экссудате, усиливает их хелперную и киллерную активность).

Материалы и методы. В исследование включено 30 больных с метастатическими серозитами в состоянии

средней тяжести, получавших до начала локорегионарной терапии соответствующее комбинированное/комплексное лечение, как правило – хирургическое в комбинации с химио-, гормоно-, иммуно- или радиотерапией. Перед началом иммунотерапии из полости удалялось 1000–3000 мл серозного, серозно-геморрагического или геморрагического экссудата. Препарат вводили в пораженную полость по 1 млн. МЕ (1 мг) на 20 мл физ. р-ра 1-5 и 8-12 дни (Σ 10 млн. МЕ, т.е. 10 мг).

Результаты. Внутриплевральная ИЛ-2 иммунотерапия, проведенная 30 больными с метастатическими экссудативными серозитами, показала высокую общую эффективность (86%), в виде полного прекращения (43%), существенного уменьшения (30%) или торможения экссудации (13%), что подтверждалось рентгенологически и цитологически. У подавляющего числа больных (26) в конце лечения (в остаточных количествах жидкости) опухолевые клетки в экссудате отсутствовали. В процессе наблюдения в течение 20 мес. 9 больных (30%) умерли от прогрессирования опухолевого процесса, 21 (70%) живы. Медиана ОВ не достигнута. Повторное накопление в различные сроки отмечено у 6 больных. Этот вид иммунотерапии хорошо переносим и практически не вызывал побочных эффектов, за исключением умеренной температурной реакции у некоторых больных. Внутриплевральная ИЛ-2-иммунотерапия может рассматриваться как этап комбинированного/комплексного лечения больных с диссеминированным раком.

Выводы. Учитывая высокую эффективность, хорошую переносимость и простоту применения внутриплевральная ИЛ-2-иммунотерапия может быть рекомендована для широкого использования в онкологической практике для лечения метастатических плевритов.

С.И. Яровая, К.Г. Пузаков, И.А. Зайцева, Ю.Н. Потанов
**ПРИМЕНЕНИЕ ОКСАЛИПЛАТИНА
 В ЛЕЧЕНИИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО РТК
 ОКОД, г. Воронеж**

Лекарственное лечение генерализованного РТК недостаточно эффективно. Малая чувствительность РТК к ХТ обусловлена во многом низкой пролиферативной активностью опухолевых клеток. Поэтому целесообразно использование ХТ, создающих постоянную концентрацию препарата в организме. Длительная инфузия комбинации ФУ и лейковорина в сочетании с оксалиплатином – один из стандартов паллиативной ХТ РТК.

Задача. оценить эффективность схемы FOLFOX4 при лечении больных генерализованным РТК.

Материал и методы. Пролечено 28 больных генерализованным раком ободочной кишки, 16 мужчин и 12 женщин ср. возраст 62 и 56 лет. У 8 пациентов (28,6%) в анамнезе оперативное лечение первичной опухоли, у 20 – генерализация при первичном обращении, 12 из них произведены паллиативные гемиколэктомии. У 21 больного (75%) манифестацией генерализации были метастазы в печень, у 7 – в лимфатические узлы и/или легкие, яичники, брюшину. Гистологически у всех пациентов была аденокарцинома разной степени дифференцировки. У 22 пациентов общее состояние оценивали в 1–26 (ECOG), у 6–36. Пациентам проводили ХТ FOLFOX4 в стандартном режиме.

Результаты. В среднем проведено 5 курсов ХТ (2–11). Осложнения: диспепсический синдром I ст., лейкопения, периферическая нейропатия I-II ст., не требовавшие вмешательства. Стабилизация до 6,8 мес. наблюдалась у 18 пациентов (64,3%), у 3 из них > 12 мес с улучшением качества жизни. У 4 пациентов (14,3%) достигнута ЧР 6,0 мес. Прогрессирование констатировано у 6 пациентов (21,4%).

ПР не было.

Выводы. FOLFOX4 хорошо переносим, применение позволяет в определенной степени контролировать генерализованный РТК.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОНКОЛОГИЯ

А.А.Бабаев, В.В.Новиков

СТРУКТУРА ПУЛА РАСТВОРИМЫХ МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород

Растворимые молекулы адгезии входят в состав пула растворимых форм дифференцировочных молекул лейкоцитов и выполняют функции, направленные на регуляцию иммунного ответа и межклеточных взаимодействий. К растворимым молекулам адгезии относят белки крови, принадлежащие нескольким семействам, в том числе растворимые молекулы ICAM-1, ICAM-3 (CD54, CD50), LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11a/CD18). Эффекторное действие растворимых дифференцировочных молекул зависит от особенностей их наноструктурной организации, то есть от того, находятся ли они в мономерной или олигомерной форме, образуют ли ассоциаты с лигандами или формируют более сложные растворимые наноструктуры, находящиеся в межклеточном пространстве, в том числе – в плазме (сыворотке) крови. В предыдущих исследованиях нами показано что растворимые молекулы адгезии CD18, CD50, CD54 входят в состав таких растворимых гетеромерных ассоциатов дифференцировочных молекул, как CD18-CD54 и CD18-CD50. В исследованиях ряда зарубежных авторов обнаружено существование олигомерных форм растворимых молекул CD54. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о наличии в крови гомоолигомерных белковых наноструктур, построенных из растворимых молекул CD18 или CD50. Кроме того, с применением различных вариантов иммуноферментного анализа показано существование растворимых молекул CD11b, представляющих собой α-цепь гетеродимера Mac-1.

Изучено сывороточное содержание обнаруженных наноструктурных форм растворимых молекул адгезии. Показан различный характер изменений сывороточного уровня олигомерных форм растворимых молекул CD18 и CD50 при раке легкого, раке эндометрия, хроническом миелолейкозе, раке молочной железы. Сывороточный уровень тестированных олигомерных наноструктур находится в сложной взаимосвязи с содержанием суммарных фракций данных молекул адгезии, а также с изменениями в содержании растворимых ассоциатов CD18-CD54 и CD18-CD50. Получены данные о связи сывороточного содержания разных наноструктурных форм растворимых молекул адгезии с особенностями опухолевых процессов разного генеза, а также о возможной мониторинговой значимости определения пула растворимых молекул адгезии при онкологических заболеваниях.

Работа выполнена в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России».

*Т.В. Белова, Е.С. Плеханова, Д.В. Новиков,
О.С. Янченко, В.В. Новиков*

МРНК РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АГ У БОЛЬНЫХ КРР АССОЦИИРОВАНА С КЛЕТКАМИ, ЦИРКУЛИРУЮЩИМИ В КРОВИ

ННГУ им. Н.И. Лобачевского, НГМА, Н. Новгород

Задачи исследования. Ранее проведенные исследования показали, что матричная РНК раково-тестикулярных антигенов выявляется в крови онкологических больных с помощью ОТ-ПЦР (Новиков Д.В. и др., 2008). Однако, вопрос о том, каков источник мРНК, неясен. Обнаруживаемые в крови мРНК различных раково-тестикулярных антигенов могут принадлежать на-

ходящимся в кровотоке метастазирующим опухолевым клеткам, могут быть продуктом деградации опухолевых клеток и циркулировать в свободном виде или могут быть связаны с поверхностью клеток крови. Исходя из этого, задача работы состояла в определении источника обнаруживаемой в периферической крови больных КРР мРНК раково-тестикулярных АГ.

Материалы и методы. В работе использована периферическая кровь 16 больных КРР, проходивших лечение в ГУЗ ОКБ им. Семашко. Свежую кровь разделяли центрифугированием на клеточную фракцию и надосадок. Внеклеточные мРНК, ассоциированные с поверхностью клеток, смывали с помощью ЭДТА и кратковременной обработки клеток трипсином. Матричную РНК раково-тестикулярных антигенов определяли с помощью метода гнездовой ПЦР.

Результаты и выводы. Показано, что у больных КРР на первой и второй стадиях заболевания мРНК GAGE, PAGE, XAGE, MAGE-C, SSX и NY-ESO-1 выявляется только в клеточной фракции, свободной от мРНК, ассоциированной с поверхностью клеток. Это указывает на циркуляцию метастазирующих опухолевых клеток в кровяном русле уже на первой и второй стадиях КРР. На третьей стадии мРНК исследуемых антигенов была также выявлена в составе метастазирующих клеток. Кроме того, она детектировалась в элюате, полученном после обработки клеток трипсином, что свидетельствует о наличии мРНК раково-тестикулярных антигенов на поверхности клеток. На четвертой стадии колоректального рака мРНК раково-тестикулярных антигенов выявлялась в клетках, а также смывах с клеток, полученных с помощью трипсина. В плазме крови, свободной от клеточного материала, мРНК раково-тестикулярных антигенов не обнаруживалась. Таким образом, мРНК раково-тестикулярных антигенов принадлежит метастазирующим опухолевым клеткам, присутствующим в кровотоке онкологических больных уже на первых стадиях, или связана с поверхностью циркулирующих клеток.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 09-04-97081-р-новолжье-а.

*Т.А. Богуш, М.В. Тихомиров, Е.А. Дудко,
Е.А. Богуш, Р.Ю., Раманаскайте,
К.К. Лактионов, Э.Э. Джурраев, Б.Е. Полоцкий*

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРА МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ Pgp В КЛЕТКАХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА И ОКРУЖАЮЩЕЙ НОРМАЛЬНОЙ ТКАНИ ЛЕГКОГО

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Цель исследования. Существует точка зрения, что врожденная множественная лекарственная резистентность опухоли, обусловленная выбросом противоопухолевых препаратов из клеток, предопределена гиперэкспрессией АТФ-зависимых транспортных белков (MDR-транспортеров) в соответствующей нормальной ткани. Представление базируется на сравнении средних показателей частоты их экспрессии в опухолевой и нормальной ткани разных больных, что, по нашему мнению, неадекватно поставленной задаче. Целью настоящего исследования является сопоставление экспрессии MDR-маркера Pgp в клетках НМРЛ и окружающей нормальной ткани легкого у каждого из обследованных больных.

Материалы и методы. Клетки НМРЛ и окружающей нормальной ткани получены из хирургических образцов тканей 27 пациентов. Экспрессия Pgp исследована методом проточной цитофлуориметрии с использованием FITC конъюгированных моноклональных и соответствующих изотипических антител. Специфическую флуоресценцию клеток анализировали с помощью программы WinMDI, количество специфически окрашенных клеток определяли методом Колмогорова-Смирнова. Проведено сопоставление экспрессии Pgp в опухолевых и нормальных клетках по средним показателям в группе обследованных больных и у каждого из обследованных пациентов.

Результаты.

1. В группе обследованных больных не выявлено различий между средними показателями экспрессии Pgp в клетках НМРЛ и окружающей нормальной ткани: количество специфически окрашенных клеток составило 24,8 и 20,1%, а отношение специфической к изотипической флуоресценции клеток – 1,7 и 1,5 соответственно.
2. При сравнении показателей экспрессии Pgp в нормальной и опухолевой ткани легкого индивидуально у каждого больного выявлены значительные различия. Совпадение отношения специфической флуоресценции клеток к изотипической и количества специфически окрашенных клеток в нормальной и опухолевой ткани отмечено в 60 и 55% случаев соответственно. Среди остальных пациентов эти показатели в клетках нормальной ткани легкого были ниже (в 45 и 73% случаев), или выше (в 55 и 27% случаев), чем в НМРЛ.

Выводы. На примере НМРЛ и одного из основных маркеров множественной лекарственной резистентности – Pgp – показано, что врожденная множественная лекарственная резистентность опухоли не предопределена экспрессией MDR-фенотипа в соответствующей нормальной ткани и является независимой патогенетической характеристикой опухоли.

Поддержано Грантом РФФИ № 09-04-13560.

А.А. Вартамян

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ВАСКУЛОГЕННОЙ МИМИКРИИ ПРИ МЕЛАНОМЕ

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Актуальность проблемы. Термин «васкулогенная мимикрия» (ВМ) был введен в 1999 г. группой американских ученых для описания уникальной особенности высоко агрессивных опухолевых клеток формировать сосудистую сеть, имитирующую васкуляризацию эмбриона. Тот факт, что наличие компонента ВМ описывается при многих высоко агрессивных, метастатических опухолях говорит о том, что мы имеем дело с новой характеристикой злокачественной опухоли. В настоящем докладе будет вынесен на дискуссию материал, аккумулированный за последние 5 лет по проблеме становления ВМ при злокачественных новообразованиях.

Методы. В работе были использованы клетки меланомы, выведенные в клеточную линию из операционного материала больных диссеминированной меланомой, а также срезы из опухолевого материала больных. Мы оперировали методами формирования СПС в 3D-культуре, иммуногистохимии, иммуноцитохимии, проточной цитофлуориметрии, электрофореза белков, иммуноблоттинга, определяли инвазивный потенциал и миграцию клеток, а также подтверждали полученные результаты в *in vivo* экспериментальной модели меланомы.

Результаты. СПС формируют высоко инвазивные клетки, низко инвазивные клетки подобных структур

не дают. Основные геометрические параметры рисунка васкулогенной мимикрии формируются на самой начальной стадии процесса. Для формирования СПС необходима не репрессированная апоптотическая машина. Движущей силой формирования СПС является высокий уровень ROS в клетке. Формирование сосудисто-подобных структур находится под контролем VEGF. В отличие от образования ангиогенных сосудов, васкулогенная мимикрия опухоли запускается VEGFR1. Выявление компонента ВМ в опухолевых срезах коррелирует с частотой метастазирования.

Заключение. В последние годы стало ясно, что

1. Не все опухоли отвечают на антиангиогенную терапию.
2. Более того, через несколько курсов терапии наступает резистентность.

Единственно разумное объяснение этому является существование других механизмов (кроме VEGF/VEGFR2), регулирующих ангиогенез опухоли, и возможно, существования дополнительной системы кровотока в опухоли. ВМ при злокачественных заболеваниях может быть одной из таких систем.

Н.В. Голубцова, Н.Б. Преснякова, В.В. Новиков,

К.А. Барышников, И.Н. Михайлова, А.Ю. Барышников

СОДЕРЖАНИЕ СЫВОРОТОЧНОГО УРОВНЯ РАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ МОЛЕКУЛ HLA I КЛАССА У БОЛЬНЫХ

С ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ ПРИ ДЕНДРИТНОКЛЕТОЧНОЙ ВАКЦИНОТЕРАПИИ

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород

Задачи исследования. Исследовать содержание сывороточного уровня растворимой формы молекул HLA I класса у больных диссеминированной меланомой кожи в процессе вакцинотерапии дендритными клетками.

Материалы и методы. Материалом для исследования явились образцы сывороток периферической крови 55 больных, которые после хирургического удаления опухоли получали дендритную вакцину (6–27 вакцинаций) с интервалом в 1 мес. Образцы сывороток готовы до введения вакцины и перед каждой последующей вакцинацией. В качестве контроля использовали сыворотки 32 здоровых доноров. Определение сывороточного уровня проводили иммуноферментным методом с использованием МКА серии ИКО и поликлональных антител, специфичных к мембранным протеинам моноклеарных клеток крови человека. Результаты выражали в условных единицах (U/ml).

Результаты и выводы. Среднее значение концентрации сывороточного уровня растворимой формы молекул HLA I класса у здоровых доноров составило 1012 ± 36 U/ml, при этом уровень колебался 800–1200 U/ml. Для унификации анализа высчитывали процент угнетения или стимуляции уровня по сравнению с контролем. У здоровых доноров колебания уровня, по сравнению со средним его значением, составили 20%. В зависимости от изменения содержания уровня в образцах сыворотки крови пациентов больные были разделены на 3 группы. В процессе вакцинотерапии у пациентов 1 группы (10 человек) наблюдали линейное повышение уровня 70–250%. Во 2 группе (13 пациентов) с пониженным начальным содержанием сывороточного уровня растворимой формы молекул HLA I класса наблюдалось снижение уровня, а в 3 группе (32 пациента) в течение первых 5 вакцинаций наблюдалось умеренное снижение до нижних границ нормы, а затем – повышение до контрольного уровня. Изучается корреляция полученных показателей содержания сывороточного уровня растворимой формы молекул HLA I класса с клиническими характеристиками данных больных.

Г.А. Гордина, А.В. Киселев, И.Ю. Кубасова,
С.А. Зорина, О.И. Тарасова

ПАТЕНТЫ

В РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН В 2009 ГОДУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

На 1 января 2009 года в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН имелось 40 патентов. Объектами патентных прав поддерживаемых патентов являлись: способы диагностики и лечения различных форм злокачественных опухолей; способы криоконсервирования пуповинной крови; способ получения противоопухолевых препаратов; противоопухолевые средства; клеточные линии, используемые для скрининга противоопухолевых препаратов и получения противоопухолевых вакцин; устройства медицинского назначения.

В создании интеллектуальной собственности РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН следует отметить наибольшую активность научных сотрудников НИИ ЭДиТО и НИИ КО. Из 25 поддерживаемых в силе патентов авторами 18 изобретений являлись сотрудники НИИ ЭДиТО; 13 – сотрудники НИИ КО. Восемь изобретений созданы при совместном участии институтов.

В результате научного сотрудничества с другими НИИ (ФГУП «ГНЦ НИОПИК», ИОФ им. А.М. Прохорова РАН, МГУ им. М.В. Ломоносова и др.) получены 8 патентов на изобретения.

Пять изобретений из числа поддерживаемых в силе патентов включены Федеральным институтом промышленной собственности в базу «Перспективные изобретения», два изобретения РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН награждены Федеральной службой по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам Дипломом в номинации «100 лучших изобретений России».

В связи с невозможностью коммерческого использования и необходимостью экономии средств поддержание в силе 15 патентов было прекращено до истечения правового срока. Таким образом, к концу 2009 г. поддерживались в силе 25 патентов, которые потенциально могут быть использованы с коммерческой целью.

И.Н. Григорьева, Е.В. Степанова, Н.Н. Семенов,
Н.В. Доброва, А.Ю. Барышников

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ В ТКАНИ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА И ОТВЕТ НА ПЕРВУЮ ЛИНИЮ ХИМИОТЕРАПИИ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Введение. Анализ экспрессии маркеров химиорезистентности в ткани первичной опухоли КРР может предсказать эффективность химиотерапевтического лечения. Целью настоящего исследования является определение корреляции между экспрессией маркеров химиорезистентности в ткани КРР и ответом на первую линию ХТ.

Материалы и методы. 100 больных КРР получали фторпиримидины и/или Оксалиплатин в качестве первой линии ХТ. Иммуногистохимическое исследование 6 молекулярно-биологических маркеров было проведено на срезах с парафиновых блоков первичной опухоли с использованием антител к тимидин фосфорилазе (ТФ) (1:100, POGF 44C, Calbiochem), тимидилат синтазе (ТС) (1:50, TS106, Chemicon), Топоизомеразе I (1:100, Ab-1, Abcam), Топоизомеразе II альфа (1:200, KiS1, DAKO), Ki-67 (1:50, M1B1, DAKO) и XRCC-1 (1:500, Ab-3(144), NeoMarkers).

Результаты. Эффективность ХТ колоректального рака не коррелирует с такими клинико-морфологически-

ми характеристиками как размер опухоли, локализация опухоли и стадия заболевания. Высокая эффективность Оксалиплатина в первой линии химиотерапии коррелирует с низким уровнем экспрессии Топоизомеразы I и XRCC1 в ткани первичной опухоли. В опухолях, отрицательных по Топоизомеразе I, выживаемость без прогрессии составляет 8,2 мес., а в опухолях, положительных по маркеру, – 1,7 мес. ($p=0,034$). В опухолях, отрицательных по XRCC-1, выживаемость без прогрессии составляет 6,6 мес., а в опухолях, положительных по маркеру, – 1,6 мес. ($p=0,051$). Уровень экспрессии ТС и ТФ в ткани первичной опухоли может предсказать эффективность фторпиримидинов в качестве первой линии химиотерапии. Низкий уровень экспрессии ТФ в ткани первичной опухоли коррелирует с низкой, а низкий уровень экспрессии ТС – с высокой эффективностью лечения метастатической болезни фторпиримидинами.

Выводы. Определение экспрессии Топоизомеразы I, XRCC-1, ТФ и ТС в опухоли является перспективным маркером предсказания эффективности лечения больных метастатическим колоректальным раком режимами с использованием фторпиримидинов и/или оксалиплатина.

Работа осуществлялась при финансовой поддержке Московского Правительства.

Н. Гуррам, Д.В. Новиков, К.В. Березин, Т.В. Белова,

А.В. Калугин, А.В. Алясова, В.В. Новиков

МРНК РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АГ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ

ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород
НГМА, Н. Новгород

Задачи. Среди опухоле ассоциированных антигенов выделяют группу раково-тестикулярных антигенов, которые обнаруживаются в опухолевых клетках различного происхождения в различных комбинациях и имеют прогностический потенциал. Обнаружено, что мРНК, кодирующая раково-тестикулярные антигены, встречается не только в опухолевом очаге, но и в периферической крови онкологических больных. Матричная РНК MAGE-A1-6 антигенов обнаружена на всех стадиях опухолевого процесса в крови больных раком молочной железы, раком легкого и раком эндометрия (Новиков Д.В. и др., 2009). Задачей настоящего исследования явилось исследование встречаемости матричной РНК раково-тестикулярных XAGE, GAGE, SSX и MAGE-C антигенов в крови и опухолевых очагах больных раком почки.

Материалы и методы. В ходе работы были исследованы образцы периферической крови и опухолевых очагов, полученные от 34 больных раком почки, прошедших лечение в Приволжском медицинском центре (Н. Новгород). мРНК раково-тестикулярных АГ XAGE-1, GAGE1-9, SSX-1,2,4 и MAGE-C определяли методом гнездовой ОТ-ПЦР с применением разработанных авторами праймеров. Результаты реакции учитывали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле.

Результаты и выводы. В образцах опухолевых очагов больных раком почки мРНК XAGE-1; GAGE1-9 и SSX-1,2,4 антигенов выявлялись в 44; 33 и 67 % случаев, соответственно. В периферической крови больных раком почки матричные РНК XAGE-1, GAGE1-9 и SSX-1,2,4 АГ выявлялись в 40, 78 и 84 % случаев соответственно. Ни в одном образце периферической крови и опухолевых очагов не обнаружена мРНК АГ MAGE-C. Таким образом, при раке почки как в опухолевых клетках, так и периферической крови обнаруживается мРНК различных раково-тестикулярных АГ.

Исследование поддержано ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, ГК №П802.

Гурцевич В.Э., Смирнова К.В., Дидук С.В.,
Сенюта Н.Б., Щербак Л.Н., Гончарова Е.В.,
Степина В.Н., Ковригина А.М.,
Никулин М.П., Яковлева Л.С.

**РАК ЖЕЛУДКА И ВИРУС ЭПШТЕЙНА-БАРР:
ЛИТЕРАТУРНЫЕ ДАННЫЕ
И СОБСТВЕННЫЕ НАБЛЮДЕНИЯ**
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

По данным МАИР в структуре онкологической заболеваемости населения земного шара рак желудка занимает четвертое место после рака легкого, молочной железы и толстой кишки. В России заболеваемость РЖ занимает второе место среди злокачественных опухолей всех локализаций. Ежегодно число случаев этого заболевания в нашей стране увеличивается на 48,8 тыс. и около 45 тыс. умирает от этой патологии. К числу известных факторов риска, влияющих на уровень заболеваемости РЖ, следует отнести инфекцию *Helicobacter pylori*, высокое потребление соли, низкое потребление свежих овощей и фруктов, курение, ожирение и ряд других. Среди инфекционных агентов кроме *Helicobacter pylori* к факторам риска относят также и вирус Эпштейна-Барр (EBV).

Впервые ассоциация EBV с РЖ была продемонстрирована в конце 1990-х гг. для редко встречающегося лимфоэпителиома подобного (ЛЭП) варианта опухоли. Вскоре EBV-инфекцию в виде малой РНК вируса (EBER) стали обнаруживать методом ISH в опухолевых клетках типичных, гистологически часто встречающихся случаев заболевания. При этом число EBV⁺-вариантов РЖ в этой группе опухолей колебалось от 1,8 до 16%, в зависимости от географического региона, в то время как среди ЛЭП-подобных опухолей этот показатель достигал 80%.

В наших более ранних работах при изучении методом ISH образцов опухоли от 430 больных РЖ EBER⁺-случаи были выявлены у 49 пациентов, что составляет 11,4% и соответствует среднестатистическому мировому показателю (10%) для этой EBV-ассоциированной патологии. При этом вирусную РНК, обнаруживали практически в 80–100% эпителиальных опухолевых клетках, но не в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах. Однако позитивные сигналы EBER у больных РЖ в ряде исследований были обнаружены и в лимфоцитах, инфильтрирующих слизистую оболочку желудка, не подверженную неопластическому процессу или в лимфоцитах реактивных лимфатических узлов. Эти данные, а также идентификация *LMP1* в высоком проценте реактивных лимфоцитов в опухолях, не ассоциированных с вирусом (РЖ^{EBV-}), поднимает вопрос о роли EBV в патогенезе EBV⁺ форм этого заболевания.

Для внесения ясности в данную проблему нам представлялось важным на первом этапе исследования выяснить наличие генетических различий между вариантами EBV, персистирующими в опухолевой ткани больных РЖ^{EBV+} и в организме этих же больных, ранее первично инфицированных этим вирусом. С этой целью нами был проведен сиквенный анализ одного из онкогенов EBV, *LMP1*, амплифицированного из опухолевой ткани указанных больных и клеток ротоглоточных смывов этих же больных. Проведенные исследования показали, что в некоторых случаях сиквенсы образцов *LMP1* из изучаемых биологических материалов были идентичными, в других – существенно различались. Выявленные различия, по видимому, могут быть объяснены результатом репликации исходно инфицирующего варианта ВЭБ в двух типах клеток – лимфоидных (в опухоли) и эпителиальных (в ротоглотке).

Нельзя исключить, однако, и возможности вторичного инфицирования больного дополнительным отличающимся штаммом вируса. Полученные данные являются начальным этапом в изучении роли ВЭБ в патогенезе РЖ^{EBV-} и нуждаются в продолжении исследований на репрезентативном клиническом материале с использованием дополнительных методов и современных технологий.

¹Деженкова Л.Г., ¹Тевяшова А.Н., ¹Збарский В.Б.,
¹Олсуфьева Е.Н., ²Штиль А.А., ¹Преображенская М.Н.

**ОПРЕДЕЛЯЮЩАЯ РОЛЬ
О-АЦИЛЬНЫХ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ
В УГЛЕВОДНЫХ ФРАГМЕНТАХ
ОЛИВОМИЦИНА А В ЦИТОТОКСИЧНОСТИ
И ИНГИБИРОВАНИИ ТОПОИЗОМЕРАЗЫ I**

¹НИИНА им. Г.Ф. Гаузе РАМН, Москва
²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Цели. Исследование роли О-ацильных заместителей в проявлении цитотоксического эффекта оливомицина А, его природных и полусинтетических производных. Выяснение механизма цитотоксического действия антибиотиков группы ауреоловой кислоты.

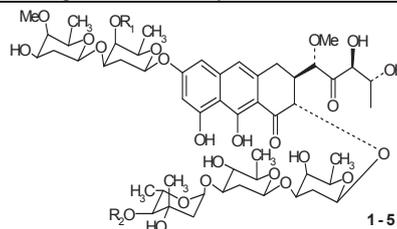
Методы. Природные антибиотики (1; 2; 3) выделены из смеси оливомицинов, получаемой при ферментации штамма-продуцента. Деацилированные производные (4; 5) получены путем селективного щелочного гидролиза О-ацильных групп в ди- и трисахаридном остатке. Цитотоксичность определяли в МТТ-тесте при действии соединений на клетки линии НСТ116. Мишень-направленное действие на ДНК-зависимый фермент топоизомеразу I изучали в реакции релаксации суперскрученной плазмидной ДНК (в диапазоне концентраций 0,1–10 мкМ).

Результаты. Оливомицин А и производные 2 и 3 вызывали гибель клеток и ингибировали топоизомеразу I в субмикромольных концентрациях. Производные оливомицина А, содержащие лишь ацетильную группу в дисахаридном остатке (5) или не содержащие ацильных групп в дисахаридной и трисахаридной ветвях (4), оказались не цитотоксичны и не влияли на активность топоизомеразы I.

Таблица

Соединение	R ₁	R ₂	IC ₅₀ , μМ (НСТ116)*	Ингибирование топо I **
1	Ac	(CH ₃) ₂ CHC(O)	< 0,025	+++
2	H	(CH ₃) ₂ CHC(O)	0,28±0,05	+
3	Ac	Ac	0,064±0,006	++
4	H	H	> 50	нет эффекта
5	Ac	H	> 50	нет эффекта

*данные 3 экспериментов; **полуколичественная оценка.



Выводы. При изучении серии природных противоопухолевых антибиотиков – оливомицинов и их полусинтетических производных выявлена определяющая роль О-ацильных заместителей в углеводных остатках в антипролиферативной активности и ингибировании ключевого фермента – топоизомеразы I. Удаление О-ацильных остатков в углеводных фрагментах значительно сильнее снижает цитотоксичность, чем О-метилирование, О-ацетилирование агликона или модификация боковой цепи антибиотика.

*А.В. Калугин, Т.В. Белова, Е.С. Плеханова,
Д.В. Новиков, К.А. Коровушкина,
Е.Ю. Конторщикова, В.В. Новиков*
**СРАВНЕНИЕ ВСТРЕЧАЕМОСТИ мРНК
РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АГ
В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ
МИОМОЙ МАТКИ И РАКОМ ЭНДОМЕТРИЯ**
НИИ МБРЭ ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород
НГМА

Задачи исследования. Сравнить частоту обнаружения матричных РНК NY-ESO-1, SSX-1,2,4, MAGE-C, XAGE-1, GAGE1-8 и PAGE-1 АГ в периферической крови больных миомой матки и раком эндометрия.

Материалы и методы. 32 образца периферической крови больных миомой матки и 20 образцов периферической крови больных раком эндометрия исследовали на присутствие мРНК NY-ESO-1, SSX-1,2,4, MAGE-C, XAGE-1, GAGE1-8 и PAGE-1 методом ОТ-ПЦР с использованием специфических праймеров.

Результаты. Суммарная частота выявления мРНК тестированных антигенов при раке эндометрия составила 40 %, а при миоме матки – 31,3 %. В образцах периферической крови больных раком эндометрия мРНК NY-ESO-1 обнаружена в 30 % случаев, мРНК PAGE-1 – в 20 % случаев, мРНК XAGE-1 – в 18 % случаев, мРНК SSX-1,2,4 – в 12 % случаев, а мРНК GAGE1-8 – в 10 % случаев. При этом в образцах крови 5 больных раком эндометрия была обнаружена мРНК одного из исследуемых антигенов, а в 3 образцах крови – мРНК двух АГ. Ни один образец периферической крови больных раком эндометрия не содержал матричные РНК более чем двух АГ. В образцах периферической крови больных миомой матки чаще выявлялись мРНК SSX-1,2,4 (19 %), мРНК PAGE-1 (18 %), мРНК NY-ESO-1 (12 %) и мРНК XAGE-1 (11 %). Реже экспрессировалась мРНК GAGE1-8 (4 %).

При этом мРНК хотя бы одного АГ была обнаружена в образцах крови 10 больных миомой матки, мРНК двух АГ – в крови 2 пациентов и мРНК 3 АГ – в крови 1 пациента (XAGE-1, PAGE-1 и SSX-1,2,4). Ни в одном из исследованных образцов периферической крови больных раком эндометрия и миомы матки мРНК MAGE-C обнаружена не была.

Выводы. Матричная РНК NY-ESO-1, SSX-1,2,4, MAGE-C, XAGE-1, GAGE1-8 и PAGE-1 встречается как при раке эндометрия, так и при миоме матки.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России».

*Д.И. Князев, Т.А. Сахарнова, Д.В. Новиков,
А.В. Алясова, В.В. Новиков*

**АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ И ПОЛИМОРФИЗМА
ГЕНА ICAM-1 ПРИ РАКЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ**
НИИ МБРЭ ННГУ им. Н.И. Лобачевского Н. Новгород

Задачи исследования. Согласно опубликованным данным, повышенная экспрессия ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) при раке может как подавлять развитие опухоли, так и способствовать агрессивному опухолевому росту и усилению метастатического потенциала. В настоящей работе проведено исследование образцов опухолей ТК на наличие матричных РНК, кодирующих мембранную и растворимую формы ICAM-1; выполнено сравнение уровня растворимого ICAM-1 в сыворотке крови между пациентами и условно здоровыми донорами; проведено генотипирование больных по однонуклеотидному полиморфизму (SNP, single nucleotide polymorphism) rs5498 – замене аденина на гуанин, приводящего к аминокислотной замене лизин-глутамин в составе трансмембранного домена ICAM-1.

Материалы и методы. В исследование было включено 49 больных КРР в возрасте от 45 до 84 лет с хирургически извлеченной первичной опухолью на разных стадиях патологии. Детекцию мРНК мембранной и растворимой форм ICAM-1 в образцах опухолей проводили методом ОТ-ПЦР.

Генотипирование по SNP rs5498 выполняли методами ПЦР и секвенирования. Определение уровня растворимого ICAM-1 в сыворотке крови выполняли двухсайтовым иммуоферментным методом с использованием моноклональных антител ИКО-184, специфичных к ICAM-1, и поликлональных антител, специфичных к мембранным антигенам мононуклеарных клеток крови человека.

Результаты и выводы. мРНК мембранной формы ICAM-1 наблюдалась в 84% случаев, из них в 34% случаев обнаруживалась мРНК растворимой формы. Случаев экспрессии мРНК только растворимой формы в опухолевых очагах не наблюдалось. У больных без метастазов мРНК растворимой формы выявлялась в 35% случаев, тогда как у больных с регионарными и отдаленными метастазами – в 13% случаев.

Таким образом, можно предположить, что наличие растворимой формы мРНК ICAM-1 ассоциировано с пониженным риском возникновения метастазов. Уровень растворимого ICAM-1 в сыворотке крови больных был вдвое выше, чем у доноров, независимо от присутствия мРНК ICAM-1 в клетках опухолевых очагов. Распределение генотипов по SNP rs5498 было следующим: AA–33%, AG–49%, GG–18%, частота аллеля А составила 57%, G – 43%.

Полученные данные соответствуют ранее опубликованным результатам исследователей из Германии.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России».

*Короленкова Л.И., Степанова Е.В., Ермилова В.Д.,
Барышников А.Ю., Брюзгин В.В.*

**МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА
ВНУТРИЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЙ
ШЕЙКИ МАТКИ**

РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Цель исследования. Определение уровня экспрессии молекулярно-биологических маркеров (Ki-67, ТФ, PTEN) при внутриэпителиальных гиперплазиях шейки матки и их значения для определения степени дисплазии.

Было исследовано образцы от 52 больных с CIN шейки матки: из них 12 CIN 1; 16 CIN 2 и 24 CIN 3. В качестве контрольных исследованы 10 образцов нормальной ткани шейки матки. Было проведено иммуногистохимическое исследование экспрессии Ki-67, ТФ, PTEN в фиксированных в формалине, заключенных в парафин блоках тканей шейки матки, взятых при выполнении петлевых эксцизий и конусовидных ампутаций. Для каждого маркера оценивались процент положительных клеток и интенсивность окрашивания.

В нормальной эпителиальной ткани шейки матки обнаружен низкий уровень экспрессии Ki-67. Экспрессия Ki-67 локализуется в базальных слоях эпителия, средний индекс Ki-67-положительных клеток не превышает 7±4%.

При увеличении степени CIN происходит увеличение количества Ki-67 положительных клеток до 18±6% при CIN 1, 57±12% при CIN 2 и 87±9% при CIN 3. При CIN2 Ki-67⁺ клетки присутствуют только в слоях, соответствующих 1/2 толщины эпителия, тогда как при CIN 3 они выявляются по всей толщине эпителия. Экспрессия ТФ также значительно увеличивается с увеличением стадии CIN.

Чем выше стадия CIN, тем больше ТФ⁺-клеток наблюдается в слоях, соответствующих базальному и парабазальному слоям эпителия. Также показано, что при CIN 3 в 15% случаях наблюдается снижение экспрессии PTEN в эпителиальных клетках.

Таким образом показано, что индекс Ki-67 и экспрессия TP в эпителии прямо коррелируют со степенью дисплазии. Они могут играть важную роль в канцерогенезе предраковых поражениях шейки матки и могут быть использованы как молекулярные маркеры прогрессии CIN и являться объектами таргетной терапии.

А.В. Лихтенштейн

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ СОСТАВЛЯЮЩИЕ КАНЦЕРОГЕНЕЗА РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

С давних пор противостояли друг другу две идеи: «рак – болезнь генов» и «рак – болезнь регуляции генов». Первая полагала первопричиной рака генные мутации, вторая – изменения структур, управляющих геной активностью. Сегодня они взаимно дополняют друг друга: в канцерогенезе, как оказалось, есть две составляющие: мутагенез (точковые мутации, делеции, инсерции, хромосомные aberrации) и эпигенез (метилирование промоторов генов-супрессоров, глобальное деметилирование генома, модификации гистонов, микроРНК-регуляция). В рамках канцерогенеза, таким образом, уживаются несовместимые, казалось бы, начала: хаотическое (мутагенез) и высоко упорядоченное (эпигенез). Мутации редки, случайны, возникают в одиночных клетках (моноклональны). Эпигенетические события, напротив, упорядочены – охватывая геном, они координируют ряд сложных подсистем, формируются в эмбриогенезе и разворачиваются на протяжении последующей жизни. Ведущие к раку эпигенетические импринты наследуемы, возникают рано (часто на стадии доклинических изменений), одновременно во многих клетках (поликлональны), имеют детерминистический характер. Эти данные свидетельствуют в пользу эпигенетической модели возникновения рака (epigenetic progenitor model of cancer, Feinberg et al., 2006), предполагающей существование особой популяции клеток-предшественников, мутации которых порождают раковые стволовые клетки. Последние, в свою очередь, дают начало злокачественной опухоли.

*И.Н. Михайлова¹, Е.С. Панкратова², Д.А. Добрынин²,
И.В. Самойленко¹, В.В. Решетникова¹, В.М. Шелупова¹,
Л.В. Демидов¹, А.Ю. Барышников¹, В.К. Финн²*

О ПРИМЕНЕНИИ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ КОМПЬЮТЕРНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ АНАЛИЗА КЛИНИЧЕСКИХ ДАННЫХ БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

²ВИНИТИ РАН, Москва

Прогноз у больных локализованными формами меланомы кожи зависит от исходной стадии заболевания (TNM) и многих других факторов, значение которых остается малоизученным. Мы решили применить компьютерную интеллектуальную систему для выяснения ее возможности порождать прогноз больных меланомой кожи. Также мы решили оценить прогностическое значение уровня S100 – широко изучаемого биохимического маркера прогрессирования меланомы кожи – при помощи этой новой компьютерной системы.

Цель. Создание компьютерной интеллектуальной системы прогнозирования продолжительности жизни больных меланомой в зависимости от экспрессии протеина S100.

Материалы и методы. Для анализа клинических данных больных с меланомой кожи был применен ДСМ-метод автоматического порождения гипотез, который является новым средством доказательной медицины. Для этой системы была создана база данных (БД), атрибутами которой являются сведения о больных, представленные в медицинских картах (всего 50 атрибутов, включая демографические данные, гистологические характеристики, лабораторные показатели). Для каждого больного определено значение протеина S100 и общая продолжительность жизни. Созданная интеллектуальная система устанавливает сходство фактов в БД посредством процедуры индукции; найденное сходство используется для порождения гипотез о причинно-следственных зависимостях; система использует эти гипотезы для предсказания посредством аналогии наличие (или отсутствие) изучаемых эффектов (продолжительности жизни в данном исследовании); далее система осуществляет процедуру проверки того, что в начальном состоянии БД позитивные факты содержат позитивную причину, а негативные факты – негативную причину (условие отсутствия изучаемого эффекта); процедура объяснения дает возможность пополнить БД новыми фактами, если порожденных гипотез недостаточно.

Результаты. В результате проведенных экспериментов было выявлено следующее: все порожденные положительные гипотезы-причины (продолжительности жизни больше 5 лет), помимо прочих атрибутов, включая значение S100 меньше 0,120 нг/мл (лабораторная норма РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН), а все отрицательные (продолжительность жизни меньше 5 лет) – значение S100 больше 0,120 нг/мл. Для проверки работы системы применялась следующая стратегия: последовательно каждый пример из БД считался неизvestным и доопределялся средствами системы.

Выводы. Предлагаемая компьютерная интеллектуальная система является инструментом поддержки медицинских исследований со сложно структурированными данными и множеством фактов, необозримых без использования компьютерных технологий. Результаты применения ДСМ-метода как средства анализа онкологических данных демонстрируют полезность этого метода, являющегося новым инструментом доказательной медицины.

*Т.В. Михайлова, М.А. Барышников, Л.Ф. Морозова,
О.С. Бузова, И.Н. Михайлова, А.Ю. Барышников*

ЭКСПРЕССИЯ HSP70 НА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Задачи исследования. Оценить уровень экспрессии hsp70 на клеточных линиях меланомы человека и отобрать линии с высокой экспрессией как потенциально иммуногенные.

Материалы и методы. Готовили лизаты клеток меланомы человека линий mel P, mel Kor, mel Mtp, mel Il, mel Is, mel Si, mel Me, mel Gus, mel Z, mel Gi, mel Ibr, mel R, mel Rac, mel Ch, Mel Cher, полученных из опухолевого материала больных диссеминированной меланомой и выведенных в клеточную линию в лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Методом иммуноблоттинга определяли уровень экспрессии hsp70 в лизатах. Сравнивали лизаты, приготовленные из клеток, культивированных по стандартной методике, а также прогретых при температуре 42 °С на водяной бане в течение 10 мин и после заморозки при температуре –80 °С.

Результаты. Во всех 15 анализируемых клеточных линиях меланомы был обнаружен белок с молекулярной массой 70 кДа, соответствующий полноразмерному hsp70, но его количество варьировало как в различных клеточных линиях, так и в зависимости от предварительной обработки клеток.

Самое низкое содержание hsp70 обнаружено на линиях Mel Si (5,29%), Mel Kor (5,13%), Mel Ibr (5,13%), Mel Ch (5,46%). Высокое содержание hsp70 зафиксировано на линиях Mel Me (20,04%), Mel Is (15,17%), Mel Z (13,81%). Высокий уровень экспрессии hsp70 в клетках после прогревания наблюдали на клеточных линиях Mel Me (24,76%), Mel Si (11,98%).

Наибольшее количество hsp70 в клетках, подвергнутых заморозке, обнаружили на линиях Mel Si (16,47%), Mel Mtp (19,73%), Mel Is (11,12%), Mel Gi (12,38%), Mel Me (16,56%), Mel Z (14,58%).

Практически не изменялся уровень экспрессии в клетках после прогревания по сравнению с непрогретыми клетками на клеточных линиях Mel R, Mel Kor, Mel Ibr, Mel Cher, Mel P, Mel Gus, Mel Rac. Эти результаты могут указывать на то, что клетки этих линий слабо реагируют на прогревание.

Выводы. Исследованные клеточные линии меланомы различаются по уровню экспрессии hsp70, причем интенсивность ее меняется в зависимости от типа и времени воздействия на клетки. Наиболее высокий уровень экспрессии hsp70 имеют клетки после предварительной заморозки.

Предположительно, потенциально более иммуногенными являются клетки линий Mel Si, Mel Mtp, Mel Is, Mel Z после предварительной заморозки.

В.В. Новиков

ОСОБЕННОСТИ ТРАНСКРИПТОМА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

НГУ им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород

Результаты постгеномных проектов, направленных на изучение генома и транскриптома опухолевых клеток, свидетельствуют о наличии множества мутаций, обуславливающих злокачественную трансформацию клеток и прогнессирование опухолевого процесса.

В геномах раковых клеток в зависимости от гистологического типа обнаруживается от 50 до нескольких сотен значимых для развития опухоли мутаций в белоккодирующих регионах генов. Более того, обнаруживается значительная гетерогенность геномных альтераций в опухолевых клетках одного и того же типа.

Однако картина значительно упрощается, если рассматриваются молекулярно-биологические пути и процессы, в которых участвуют мутантные гены. Сложность и многообразие изменений сводится к нарушению относительно небольшого количества путей реализации биологической информации. При этом особенности нарушений могут варьировать от опухоли к опухоли.

Геномные изменения отражаются на состоянии транскриптома опухолевых клеток. Профилирование экспрессии генов показало, что в зависимости от опухоли насчитывается от нескольких сотен до нескольких тысяч генов с измененной экспрессией или генов, не характерных для данного типа клеток в норме (от 0,6 до 20 % генов).

Дисрегуляция и, как следствие, изменение уровня экспрессии зарегистрировано для генов, участвующих в передаче внутриклеточных и межклеточных сигналов, молекулярных механизмах прохождения по клеточному циклу, в апоптотических процессах, механизмах инвазии клеток, репликации и репарации ДНК.

В опухолевых клетках обнаруживается матричная РНК, кодирующая белки, характерные для эмбрионального периода онтогенеза, достаточно часто и в больших

количествах присутствует матричная РНК большой группы раково-тестикулярных антигенов, в норме принимающих участие в сперматогенезе. Многие из этих антигенов высоко иммуногенны и рассматриваются как потенциальные высокоэффективные средства для вакцинации при лечении опухолей.

В раковых клетках включается экспрессия генов, отвечающих за иммунологические процессы.

Так, в опухолевых клетках обнаруживается матричная РНК, кодирующая молекулы адгезии, в частности ICAM-1, α -цепь рецептора ИЛ-2, участвующего в активации и пролиферации клеток, а также меняется спектр экспрессии альтернативных вариантов матричной РНК молекулы Fas, опосредующей апоптоз как раковых клеток, так и клеток иммунной системы.

Д.В. Новиков, Т.В. Белова, А.В., Д.И. Князев,

Т.В. Наседкина

ВЫЯВЛЕНИЕ

МРНК РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АГ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕЛЕВОГО БИОЧИПА

НГУ им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород

Задачи исследования. Среди генов, экспрессия которых обнаруживается в опухолевых клетках, известна обширная группа раково-тестикулярных генов (cancer/testis).

Их экспрессия в соматических клетках взрослого организма подавлена эпигенетически. Ограниченная экспрессия раково-тестикулярных генов позволяет использовать их в качестве маркера неопластических процессов.

Материалы и методы. Исследовали образцы опухолевых очагов и периферической крови 25 больных раком легкого и 48 больных РТК.

В качестве отрицательного контроля использовали образцы периферической крови 30 здоровых волонтеров. Матричную РНК выявляли методом ОТ-ПЦР. Результаты реакции регистрировали методом ЭФ в агарозном геле или гибридизацией на разработанном авторами ДНК-чипе.

Результаты и выводы. Подобраны праймеры и зонды для специфичного выявления мРНК 24 раково-тестикулярных генов, относящихся к семействам BAGE, CAGE, GAGE, MAGE-A, MAGE-C, NY-ESO-I, SSX, и XAGE. При анализе частоты выявления мРНК в образцах опухолевых очагов рака легкого наиболее часто обнаруживались мРНК MAGE-A, MAGE-C, NY-ESO-I и XAGE (95, 70, 65 и 45% случаев соответственно).

В образцах опухолевых очагов РТК чаще других выявлялись мРНК MAGE-A, MAGE-C, и XAGE (68; 52 и 68% случаев соответственно).

Частота обнаружения мРНК остальных антигенов варьировала от 0 до 36 %.

Суммарная частота выявления мРНК раково-тестикулярных АГ в образцах опухолевых очагов как рака легкого, так и РТК составила 100 %. Причем в каждом образце была выявлена мРНК как минимум двух раково-тестикулярных АГ.

В образцах периферической крови больных раком легкого и РТК мРНК хотя бы одного из исследуемых раково-тестикулярных АГ выявлена в 70 и 62% случаев соответственно.

Так же как и в опухолевых очагах, в образцах периферической крови чаще других выявлялись мРНК MAGE-A, MAGE-C, NY-ESO-I и XAGE.

В образцах периферической крови от здоровых волонтеров мРНК раково-тестикулярных АГ обнаружено не было.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России».

С.В. Новикова, Н.А. Сахарнов, Д.В. Новиков, А.В. Алясова
АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА α -ЦЕПИ РЕЦЕПТОРА ИЛ-2 В КЛЕТКАХ ОПУХОЛЕВЫХ ОЧАГОВ БОЛЬНЫХ КРР

НГУ им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород

Задачи исследования. Известно, что в опухолевой клетке происходит существенный сдвиг спектра экспрессии многих генов, сопровождающийся синтезом продуктов, не свойственных данному типу ткани в норме. Так, опухолевый процесс может обуславливать появление на поверхности неопластической клетки белков, характерных для клеток иммунной системы. Одним из белков клеток иммунной системы является α -цепь рецептора интерлейкина-2 (CD25–антиген). CD25–антиген участвует в механизмах активации иммунной системы в целом и в процессах пролиферации отдельных лимфоцитов. Целью работы явилась оценка частоты встречаемости матричной РНК CD25 антигена в клетках опухолевых очагов больных КРР.

Материалы и методы. Исследовали 51 образец клеток опухолевых очагов больных КРР. Характер экспрессии гена α -цепи рецептора ИЛ-2 определяли методом ОТ-ПЦР с использованием разработанных авторами праймеров, специфичных к местам соединения экзонов мРНК. Нуклеотидную последовательность кДНК определяли с использованием дидезокси-нуклеотидного метода.

Результаты и выводы. В тестированных образцах были обнаружены полноразмерная и альтернативная формы мРНК CD25–антигена. Анализ первичной структуры альтернативной формы мРНК CD25 показал делецию 4 экзона. Обе формы мРНК CD25–антигена в клетках опухолевых очагов больных КРР были обнаружены в 92% случаев (47 из 51). В двух исследованных образцах была выявлена только полноразмерная форма мРНК CD25 АГ. В двух образцах не обнаружена ни одна форма мРНК CD25–АГ. В доступной литературе данных об экспрессии гена α -цепи рецептора ИЛ-2 в клетках опухолевых очагов больных КРР авторами не обнаружено. Появление в пуле мРНК малигнизированной клетки транскриптов данного гена может являться одним из механизмов неограниченного размножения клеток опухоли.

Кроме того, продукты посттрансляционной модификации транскриптов гена α -цепи рецептора ИЛ-2 могут принимать участие в уходе опухоли из-под надзора иммунной системы и развитии иммуносупрессии.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России».

Ж.С. Нурмаганбетов¹, А.Ж. Турмухамбетов¹, З.Т. Шульгау¹, М.В. Огородникова², С.М. Адекенов¹, А.Ю. Барышников²

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НА АПОПТОЗ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ГИДРОХЛОРИДА ГАРМИНА

¹МНПХ «Фитохимия», Караганда, Казахстан
²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Введение. Семейство каспазы – это цистеиновые протеазы, которые играют важную роль в процессе апоптоза. В каспазном каскаде каспаза-3 играет основную роль в дезагрегации ядра во время апоптоза, вызывает фрагментацию ДНК и конденсацию хроматина, активирует фактор фрагментации ДНК путем его расщепления, тем самым индуцирует образование лестницы ДНК. Таким образом, активная каспаза-3 является маркером ранней стадии апоптоза.

Цель исследования. Изучить влияние гидрохлорида гармина (ГГ) на апоптоз в отношении клеточных линий Jurkat, Raji, U937 с применением современного метода регистрации апоптоза.

Материалы и методы. В работе использовали следующие клеточные линии: Jurkat, Raji, U937. Определение активной каспазы-3 проводили после инкубации опухолевых клеток с ГГ в течение 72 часов с использованием набора FITS-Conjugated monoclonal active caspase-3 antibody apoptosis Kit 1 (BD Pharmingen, США).

Результаты. После инкубации клеток линии Jurkat с ГГ в дозе 1×10^{-5} М количество апоптотических клеток составило 13%. С увеличением концентрации ГГ до 1×10^{-4} М популяция клеток положительных по каспазе-3 увеличилась и составила 65,3 %.

После инкубации клеток линии Raji с ГГ в дозе 1×10^{-5} М количество апоптотических клеток составило 12,3%. С увеличением концентрации ГГ до 1×10^{-4} М популяция апоптотических клеток составила 56,2 %.

После инкубации клеток линии U937 с ГГ в дозе 1×10^{-5} М количество апоптотических клеток составило 9,1%. С увеличением концентрации ГГ до 1×10^{-4} М популяция апоптотических клеток составила 90 %.

Выводы. Гидрохлорид гармина обладает высокой экспрессией активной каспазы-3 в отношении опухолевых клеток линий Jurkat, Raji, U937. Данный факт свидетельствует о том, что гидрохлорид гармина вызывает гибель опухолевых клеток линий Jurkat, Raji, U937 по типу апоптоза.

А.Г. Орлова¹, А.В. Масленникова^{1,2}, Г.Ю. Голубятников¹, Т.И. Пряникова³, В.И. Плеханов¹, Л.Б. Снопова², А.А. Бабаев³, И.П. Иванова², В.А. Каменский¹, Н.М. Шахова¹, И.В. Турчин¹

НЕИНВАЗИВНАЯ ОЦЕНКА ДИНАМИКИ КИСЛОРОДНОГО СТАТУСА ОПУХОЛЕВЫХ МОДЕЛЕЙ МЕТОДОМ ОПТИЧЕСКОЙ ДИФФУЗИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ В ПРОЦЕССЕ ЕСТЕСТВЕННОГО РОСТА И НА ФОНЕ ПРОВЕДЕНИЯ ХТ

¹Учреждение РАН ИПФ, Н. Новгород

²НГМА

³НГУ им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород

Кислородный статус опухоли является одним из ключевых факторов, определяющих прогноз заболевания и эффективность лечебных воздействий. Многие терапевтические агенты изменяют данный параметр, и его определение в зоне патологии может иметь существенное значение при оценке ответа опухоли на действие терапии. ОДС позволяет неинвазивно определять содержание основных тканевых хромофоров – окисленного и восстановленного гемоглобина – и, соответственно, оценивать степень насыщения крови кислородом (StO₂) – параметр, косвенным образом отражающий кислородный статус опухоли.

Цель настоящего исследования – оценка возможностей ОДС для исследования динамики кислородного статуса экспериментальной опухоли в ходе химиотерапевтического воздействия.

Материалы и методы. Эксперименты проводились с использованием двух опухолевых моделей: ЛСП и РМЖ крыс (РМК-1), существенно различающихся по морфофункциональным характеристикам. В работе использовалась установка для ОДС, разработанная в ИПФ РАН (Н. Новгород).

Серию ОДС-исследований с интервалом 2–3 дня проводили после однократного введения циклофосфана. Для верификации результатов проводилось ИГХ с маркером гипоксии пимонидазолом.

Результаты. Для модели ЛСП методом ОДС выявлено снижение уровня StO_2 по сравнению с окружающими нормальными тканями; ИГХ подтверждено состояние гипоксии опухоли. Модель РМК-1 характеризовалась сопоставимым с нормой уровнем StO_2 и достаточной степенью оксигенации. Продемонстрировано, что данные различия вызваны главным образом разницей в содержании дезоксигемоглобина исследуемых моделей: повышенном у ЛСП и сниженным у РМК-1. Под воздействием циклофосфана наблюдалось торможение роста опухоли, на фоне которого отмечалось постепенное повышение уровня StO_2 за счет снижения концентрации дезоксигемоглобина по сравнению с контрольной группой.

Выводы. Таким образом, метод ОДС позволяет наблюдать в динамике изменения оксигенации ткани опухоли в ходе ее роста и при лекарственном воздействии.

Л.А. Островская¹, Л.В. Снегур², Н.В. Блюхтерова¹,
М.М. Фомина¹, В.А. Рыкова¹, А.А. Сименел²,
С.И. Зыкова², Ю.С. Некрасов²

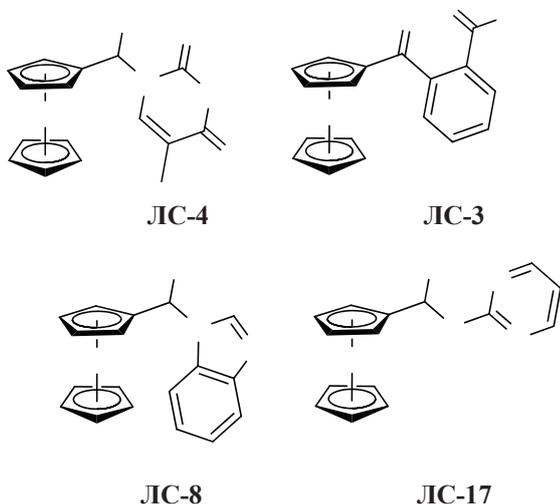
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ЭФФЕКТЫ ФЕРРОЦЕНСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

¹ИБФ им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

²ИЭС им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва

Задачи исследования. Уникальные свойства ферроценовой системы, а именно, окислительно-восстановительная активность, хорошая проницаемость через липидные мембраны, низкая токсичность, а также легкость химических модификаций, являются определяющими факторами для поиска различных видов биологической активности среди соединений ферроценового ряда. Нами разработаны препаративные подходы к синтезу ферроцен содержащих биомолекул и синтезированы с высокими выходами ферроценовые производные азолов (ЛС-8), пуриновых и пиримидиновых оснований (ЛС-4), тиопиримидинов (ЛС-17), аминокислот, а также энантимерно обогащенные ферроценовые соединения. Задача данной работы состояла в оценке противоопухолевой активности ферроценосодержащих соединений различной структуры.

Материалы и методы. Исследована токсичность и противоопухолевая эффективность ряда ферроценосодержащих производных, имеющих представленные ниже структуры. Противоопухолевый эффект препаратов изучен в кинетике на моделях солидных опухолей – LLC, карцинома 755, меланома В-16 (мыши BDF₁). Показателем ростиингибирующей активности соединений служил коэффициент ТРО%.



Результаты. Установлено, что среди изученных соединений наибольшую противоопухолевую активность проявляют препараты ферроценилметил тимин (ЛС-4) и ферроценил(этил)-2-тиопиримидин (ЛС-17), вызывающие ингибирование роста указанных солидных опухолей на 70% по сравнению с контролем.

Выводы. Обнаружены ферроценосодержащие соединения, обладающие значительной противоопухолевой активностью (ЛС-4, ЛС-17), намечены пути рационального синтеза новых производных, показана целесообразность дальнейшего углубленного изучения препаратов данной группы в онкологическом эксперименте.

Т.И. Пряникова³, А.Г. Орлова¹, А.В. Масленникова^{1,2},
Г.Ю. Голубятников¹, В.И. Плеханов¹, Л.Б. Снопова²,
И.П. Иванова², В.А. Каменский¹, И.В. Турчин¹,
Н.М. Шахова¹

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПЕНТОКСИФИЛЛИНА НА УРОВЕНЬ ОКСИГЕНАЦИИ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ МЕТОДОМ ОПТИЧЕСКОЙ ДИФФУЗИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

¹ИПФ РАН, Н. Новгород

²НГМУ

³НГУ им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород

Состояние гипоксии является характерной особенностью большинства солидных опухолей.

С целью преодоления резистентности гипоксичных опухолей в отношении лечебных воздействий используются препараты, искусственно повышающие кислородный статус тканей.

Разработка таких препаратов требует создание новых методов, позволяющих проводить неинвазивную прижизненную оценку динамики степени оксигенации тканей. В данной работе для оценки оксигенации опухоли предлагается метод ОДС.

Этот метод позволяет определять концентрацию окисленного и восстановленного гемоглобина в тканях и, соответственно, оценивать степень насыщения крови. Целью работы было исследование возможностей метода ОДС для оценки изменений оксигенации экспериментальной опухоли.

Работа проводилась с использованием опухолевой модели лимфосаркомы Плисса. В работе применялась установка для ОДС, разработанная в ИПФ РАН. По ОДС-данным рассчитывали двумерное распределение концентраций основных тканевых хромофоров в зоне опухоли и уровень оксигенации крови.

Для искусственной модификации кислородного статуса опухоли использовали пентоксифиллин, повышающий микроциркуляторную перфузию. Препарат вводили внутривенно в дозе 50 мг/кг.

Сканирование осуществляли до и через 60 мин. после введения препарата. Для верификации степени оксигенации тканей осуществляли гистологическое исследование и иммуногистохимическое окрашивание срезов опухолей с использованием пимонидазола.

Пентоксифиллин вызывал снижение концентрации дезоксигемоглобина и повышение содержания окисленной формы соединения.

Такие изменения привели к существенному росту уровня насыщения крови кислородом в проекции опухолевого узла и, соответственно, кислородного статуса опухоли.

Таким образом, метод ОДТ позволяет наблюдать изменения оксигенации опухоли при действии препарата, повышающего перфузию тканей, и может быть использован для разработки новых агентов, предназначенных для повышения кислородного статуса.

Н.А. Сахарнов, Д.В. Новиков, А.В. Алясова, С.В. Новикова, О.В. Уткин, В.В. Новиков

**АНАЛИЗ ВСТРЕЧАЕМОСТИ
ТРАНСКРИПТОВ ГЕНА *APT-1*
В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ БОЛЬНЫХ РТК**
НГУ им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород
НГМА, Н. Новгород

Задачи исследования: Fas-зависимый апоптоз является одним из способов гибели опухолевых клеток. Система Fas-Fas-лиганд имеет множественные пути регуляции, в том числе с участием растворимых форм Fas (CD95) АГ. Растворимые формы образуются в результате альтернативного сплайсинга мРНК первичного транскрипта. В настоящее время обнаружено более 10 различных вариантов мРНК Fas-АГ, встречающихся в клетках в разных сочетаниях. Целью настоящей работы явилась характеристика экспрессии гена *APT-1*(FAS) в опухолевых клетках на разных стадиях РТК.

Материалы и методы. Материалом для исследования явились 48 образцов клеток опухолевых очагов, полученных из НООД при резекции опухолей у больных РТК. мРНК Fas-АГ детектировали методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров, специфичных к местам соединения экзона пре-мРНК Fas-АГ.

Результаты и выводы: В клетках опухолевых очагов больных РТК обнаружено 7 различных вариантов мРНК Fas-АГ. Матричная РНК мембранной формы Fas-АГ детектировалась в 100% случаев. Матричная РНК доминирующей растворимой формы Fas-АГ с делецией 6 экзона обнаруживалась в 96% случаев, матричные РНК пяти минорных форм с делециями 3; 4; 5 и 6 экзона в различных комбинациях встречались с частотой от 25 до 90% случаев. При этом мРНК Fas с делецией 5 экзона отсутствовала во всех исследованных образцах на 3 стадии заболевания, а мРНК с делецией 4 экзона – во всех образцах опухолевых клеток больных с 4 стадией заболевания. Всего было выявлено 15 различных спектров мРНК, отличающихся как по числу, так и составу форм мРНК Fas-АГ. Общей особенностью больных явилась высокая гетерогенность спектров форм мРНК Fas-АГ.

Л.В. Скоторенко, О.В. Короткова, Т.Н. Заботина, А.А. Борунова, Н.Ю. Очеева

**ИММУНОФЕНОТИП ЛИМФОЦИТОВ
ПЕРВИЧНО ОПЕРАБЕЛЬНЫХ БОЛЬНЫХ РМЖ**
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Задачи исследования. Изучить линейные маркеры клеточного звена иммунитета и оценить субпопуляционную структуру лимфоцитов периферической крови первично операбельных больных РМЖ.

Материалы и методы. В исследование включены 25 первично операбельных больных РМЖ. Средний возраст пациенток составил 55,2 года. В качестве контрольных образцов использовали ПК 11 практически здоровых женщин в возрасте 25–58 лет. Многопараметровый анализ иммунофенотипа лимфоцитов ПК проводили до и через 2 нед. после хирургического лечения с использованием коммерческих наборов МКА методом проточной цитометрии (BD Biosciences, Becton Coulter).

Результаты. В результате исследования было выявлено нарушение линейной структуры лимфоцитов ПК больных раком молочной железы по сравнению с донорской группой. Проведенное хирургическое лечение не оказало влияния на динамику распределения основных популяций лимфоцитов при анализе общей группы больных. Индивидуальный анализ иммунограмм в зависимости от исходного уровня CD3 показал, что у 36% больных содержится исходно сниженное количество CD3⁺ лимфоцитов (группа 1), у 32 % пациенток исходно нор-

мальное число CD3⁺-лимфоцитов (группа 2), исходно повышенное – у 32% (группа 3). Количество CD19⁺ В-лимфоцитов соответствовало норме во всех 3 группах. У всех больных 1 группы было исходно повышено кол-во NK-клеток с фенотипом CD3⁺CD16⁺CD56⁺ (29,3 2,1), в то время как в остальных группах количество NK-клеток соответствовало нормальным показателям. Особо следует отметить, что у больных 1 и 2 групп было значительно повышено число CD8⁺- лимфоцитов, и как следствие этого снижен иммунорегуляторный индекс, который составил 0,8 и 0,68 соответственно. Таким образом, у 88% больных первично операбельным РМЖ имеется дисбаланс в структуре Т-лимфоцитов.

Выводы. Необходимо проводить индивидуальный мониторинг состояния иммунной системы больных РМЖ с целью дальнейшей коррекции субпопуляционной структуры Т-клеточного звена иммунитета и обеспечения возможности проведения адьювантной химио- и ЛТ в полном объеме.

Д.В. Соколова, Е.В. Степанова, Е.М. Трещалина, А.Ю. Барышников

**ОЦЕНКА УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ
ОСНОВНЫХ ФАКТОРОВ НЕОАНГИОГЕНЕЗА
В ПОДКОЖНЫХ КСЕНОГРАФТАХ
ЛИМФОМЫ БЕРКИТТА ЧЕЛОВЕКА**
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Перспективным средством селективного воздействия на опухолевые клетки являются иммунолипосомальные формы. Для доклинического изучения эффективности иммунолипосом адекватной моделью являются п/к ксенографты опухолей человека с подтвержденной специфичностью. Получение информации о состоянии неоангиогенеза доклинической модели, предназначенной для системного лечения, в том числе, с использованием иммунолипосом, позволяет использовать ее в терапевтическом эксперименте.

Цель исследования. Определение состояния неоангиогенеза в подкожных ксенографтах лимфомы Беркитта человека штамм ЛБР-2.

Материалы и методы. Используются мыши-самки Balb/c nude 8-10 нед 18-20 г собственного разведения и штамм ЛБР-2 из Коллекции опухолевых штаммов РОНЦ. Гистологические срезы готовили из п/к узлов опухоли, находящейся в средней точке экспоненциальной фазы роста (23 сутки после трансплантации). Состояние неоангиогенеза определяли по количеству микрососудов и экспрессии основных маркеров VEGF, CD31 и HIF-1 α с помощью метода ИГХ с системой визуализации DAB+ [ДАКО]. Оценку результатов окрашивания проводили на световом микроскопе «Nikon», увеличение $\times 40$. Количество положительных клеток оценивали в зонах максимального скопления. Опухоль считали VEGF⁺ или HIF-1 α ⁺, если окрашивание наблюдали в ≥ 25 % клеток.

Результаты. Исследование показало, что на 23 сутки п/к ксенографты ЛБР-2, достигшие среднего объема 1734[1312÷2156]мм³, имеют полноценную сосудистую сеть и активность АГ факторов. ИГХ окрашивание выявило в ткани опухоли 60–80% VEGF⁺ клеток. В поле зрения найдено 6±3 CD31⁺ микрососудов. В 80–100 % клеток отмечено накопление HIF1- α . Интенсивность ИГХ-окрашивания выше в центре опухоли.

Заключение. Лимфома Беркитта штамм ЛБР-2 в виде п/к ксенографтов в наиболее благоприятный для лечения период роста характеризуется полноценной сосудистой сетью и способностью к неоангиогенезу, о чем свидетельствуют достаточная плотность микрососудов и высокая экспрессия факторов неоангиогенеза. Указанные характеристики свидетельствуют о пригодности данной модели для проведения системной терапии в том числе, адресными агентами.

Степанова Е.В.

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ РМЖ

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

РМЖ занимает первое место по частоте возникновения среди женщин и является основной причиной смертности женщин 35–55 лет. 5-летняя ОВ больных составляет в среднем 65%, выживаемость зависит от стадии заболевания. Возможность выбора химиотерапевтических препаратов из нескольких одинаково эффективных требует от онколога рационального подхода к назначению режима лечения каждому конкретному пациенту. Клинические и морфологические характеристики болезни являются недостаточно точными для предсказания прогноза течения болезни и эффекта ХТ. Широко проводятся исследования по молекулярно-биологической характеристике РМЖ для выбора тактики рационального лечения.

В настоящее время разработана новая классификация РМЖ на основе происхождения опухоли (базальный или люминальный тип РМЖ), приведены подходы к рациональному назначению лекарственной терапии.

В РОНЦ им. Н.Н. Блохина проводятся широкие исследования по молекулярно-биологической характеристике РМЖ различного происхождения. Исследованы более 14 различных маркеров, включая Ki-67, HER-2/neu, EGFR, pAkt, PTEN, p53, Bcl-2, Vax, рецепторы эстрогенов и прогестерона, цитокератин 5/6, VEGF, CD31, HIF-1 alpha и другие. Иммуногистохимический анализ является наиболее удобным методом для тестирования, позволяющий проводить исследование большого количества маркеров. Получены результаты об экспрессии молекулярно-биологических маркеров в 4 основных молекулярно-биологических типах РМЖ. Показано, что наиболее высокая экспрессия биологически неблагоприятных маркеров (EGFR, p53, VEGF и других) наблюдается при базальном типе РМЖ (HER2–, ЭР–, ПР–, СК5/16+).

Отсутствие экспрессии PTEN в опухолевых клетках, высокая экспрессия pAkt и EGFR являются неблагоприятными факторами эффективности комбинаций химиотерапии с Герцептином для больных РМЖ, получающих лечение адьювантно или по поводу метастатической болезни (p<0,05). Высокая экспрессия тимидилат синтазы в ткани опухоли коррелирует с высокой частотой появления метастазов после удаления первичной опухоли вне зависимости от получаемого лечения (p<0,05). Разработан метод прогноза эффективности ХТ и биотерапии у больных РМЖ на основе определения молекулярно-биологических маркеров в опухоли.

Метод прогноза эффективности лечения ХТ и биотерапией может быть использован в онкологических клиниках РФ для назначения рационального лечения больных РМЖ.

Работа поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям (Государственный контракт № 02.512.12.2009 от «25» июня 2008 г.) и Советом по грантам Президента Российской Федерации для поддержки молодых российских ученых – докторов наук.

Н.М. Сураева[□], В.В. Мартиросян², А.З. Кесян²,
А.В. Самойлов[□], А.Ю. Барышников[□]

ТРАНСФЕКЦИЯ ЭКЗОГЕННОЙ ДНК ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПТИЦЫ

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

²НИИ пушного звероводства кролиководства
им. В.А. Афанасьева, МО, пос. Раменки

Современные технологии получения рекомбинантных белков открывают новые эффективные пути

производства любых белковых структур, в том числе – фармацевтических препаратов. В этой связи разработка методов введения чужеродных генов в половые клетки птицы и получение трансгенных продуцентов представляется весьма актуальной задачей, т.к. создается широкая перспектива производства белков терапевтического назначения.

Задачи исследования. Отработка метода трансфекции экзогенным геном ППК кур.

Материалы и методы. Были проведены инъекции донорских трансфецированных ППК в зону зародышевого герпа эмбриона реципиента. ППК были выделены из гонад 5,5-суточных эмбрионов. Трансфекцию клеток проводили плазмидным комплексом, содержащим целевой ген Г-КСФ человека, с помощью липосом Lipofectamin[®] 2000 (Invitrogen). С целью получения трансгенных половых химер проводили стерилизацию реципиентов перед инъекцией донорских ППК при помощи УФО по разработанной нами схеме, которая, как предполагалось, могла бы способствовать уменьшению эндогенных ППК. Инъекцированные эмбрионы инкубировали в течение 7 сут. Интеграцию гена определяли методом ПЦР, путем анализа гомогената всех тканей эмбрионов (кроме гонад) и отдельно гонад.

Результаты. Суспензией трансфецированных ППК было проинъекцировано 23 эмбриона, после 7 дней инкубации продолжили развитие 14 эмбрионов. По результатам ПЦР анализа у 3 эмбрионов был зафиксирован ген человеческого Г-КСФ, а у одного эмбриона трансгенная вставка присутствовала и в клетках гонад, при этом этот эмбрион был получен от реципиента без стерилизации (1 из 6).

Выводы. В результате разработанного метода трансфекции экзогенным геном ППК кур получена трансгенная химерная птица с присутствием экзогенного гена в половых органах. Различий в эффективности встраивания экзогенного гена в клетки половых органов в случае инъекции трансфецированных ППК реципиентам, подвергнутым стерилизации при помощи ультрафиолета, контролем обнаружить не удалось.

Степанова Е.В., Лавренов С.Н., Штиль А.А.,
Преображенская М.Н., Соломко Э.Ш., Иншаков А.Н.,
Абрамов М.Е., Личиницер М.Р.

НОВЫЙ КЛАСС ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АГЕНТОВ

НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ТРИИНДОЛИЛМЕТАНОВ

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

НИИНА им. Г.Ф. Гаузе РАМН, Москва

Соединения, содержащие фрагмент трииндолилметана, представляют класс перспективных соединений с потенциально высокой противоопухолевой активностью. Целью исследования являлся направленный синтез производных гетероциклических триарилметанов и отбор соединений, обладающих выраженным специфическим противоопухолевым действием в отношении клеточных линий РМЖ, толстой кишки, меланомы и лейкоза человека. Среди производных трииндолилметанов наибольший интерес в качестве потенциального противоопухолевого препарата представляют соли N-алкилтрииндолилметилиев. Разработаны эффективные методы их синтеза, что позволило получить соли трииндолилметилиев с высокими выходами, получено около 40 новых производных, имеющих различные заместители – как при атоме азота индольного ядра, так и в индольном цикле, изучена их реакционная способность и физико-химические свойства.

Разработана методология проведения биологических исследований на противоопухолевую активность с учетом современных представлений о механизмах роста и прогрессии злокачественных опухолей.

Методика скрининга включает не только традиционный метод – оценку цитотоксического действия препаратов, но и определение антиангиогенного, антиинвазивного, апоптотического действия синтезированных веществ. В скрининговых исследованиях *in vitro* было показано, что данный класс соединений обладает цитотоксическим действием, вызывая гибель различных клеточных линий опухолей человека РМЖ (SK-BR-3, MCF-7), яичников (SKOV-3), меланомы (Mel Kog), лейкоза (Jurkat) путем индукции апоптоза. Особенно выраженной цитотоксичностью обладает данный класс соединений в отношении меланомы. Одним из возможных механизмов противоопухолевого эффекта может быть блокирование активности белка NFκB, которое было показано в нецитотоксических дозах. Использование полного спектра методов определения противоопухолевой активности позволило эффективно оценить противоопухолевый эффект синтезированных веществ. Показана зависимость активности структуры препарата, проводится изучение механизма действия наиболее активных веществ.

Наиболее перспективными для дальнейшего изучения признаны ЛСТА-1319 (IC_{50} для клеточной линии меланомы кожи Mel Kog составила $0,236 \pm 0,067 \mu M$), ЛСТА 1574 ($IC_{50} = 0,073 \pm 0,013 \mu M$) и ЛСТА 1578 ($IC_{50} = 0,052 \pm 0,003 \mu M$).

Разрабатываемый новый класс противоопухолевых агентов на основе производных трииндолилметана в потенциале может обеспечить создание высокоэффективных противоопухолевых препаратов с различными механизмами действия для самостоятельного использования или в комбинации с традиционными лекарствами.

Работа поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям (государственный контракт № 02.512.12.2035 от «12» мая 2009 г).

Н.М. Сураева¹, В.В. Мартиросян², А.

А.В. Самойлов², А.Ю. Барышников¹

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ КУР И ГЕНОМ ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕ-СТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ЧЕЛОВЕКА

¹РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва

²НИИ пушного звероводства кролиководства им. В.А.Афанасьева, МО, пос. Раменки

Трансгенез с использованием сперматозоидов не требует больших финансовых затрат, однако предполагает использование невирусных конструкций генов. Поэтому разработка технологии введения чужеродного гена путем переноса со спермой открывает широкие возможности по использованию яйца кур для продукции фармацевтических белков.

Цель исследования – отработка метода трансфекции экзогенным геном спермы петухов и получение трансгенных цыплят после искусственного осеменения кур трансфецированной спермой.

Материалы и методы. Трансфекцию сперматозоидов проводили плазмидным комплексом, содержащим целевой ген Г–КСФ человека, с помощью липосом «Lipofectine®» и Lipofectamin®2000 (Invitrogen). После искусственного осеменения кур трансфецированной спермой проводили сбор яиц, инкубировали их 7 суток, извлекали эмбрионы и анализировали методом ПЦР. А также инкубировали собранные яйца в течении 21 дня и получали цыплят. Методом ПЦР анализировали эмбрионы и кровь полученных цыплят на присутствие экзогенной ДНК.

Результаты. Проведено 7 осеменений кур трансфецированной спермой с применением «Lipofectine®». Было собрано 51 яйцо, из которых было получено 29 эмбрионов, один из которых оказался трансгенным. Далее было проведено 3 осеменения кур трансфецированной спермой с помощью «Lipofec-

tamin® 2000». Собрано 20 яиц, из них получено 9 эмбрионов, 3 из которых оказались трансгенными. Трансфецированной спермой с этим же липофектантом было осеменено еще 3 курицы, собрано 20 яиц, из которых вылупились 6 цыплят. У 2 была зафиксирована экзогенная ДНК. В возрасте 3–4 мес.в в крови трансгенных кур была обнаружена экспрессия гена Г–КСФ человека на уровне 20–70 пг/мл.

Выводы. В результате разработанного метода трансфекции спермы петухов были получены трансгенные цыплята, зафиксирована экспрессия гена Г–КСФ человека и показано, что эффективность встраивания экзогенного гена значительно увеличивается при использовании липосом Lipofectamin®2000 (Invitrogen).

Н.С. Торгушина С.С. Кузнецов

О ВОЗМОЖНОСТЯХ И НЕОБХОДИМОСТИ ОЦЕНКИ БЛИЖАЙШИХ РЕЗУЛЬТАТОВ (ПАТОМОРФОЗА) ХТ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ НГМА, Н. Новгород

Химиотерапевтический патоморфоз имеет гамму специфических особенностей, выделяющих его из известных ныне видов патоморфоза, игнорирование которых не позволяет четко оценить итог проведенного лечения и сформулировать прогноз в отношении конкретного пациента. В литературных источниках нет ясности о ценности различных морфологических характеристик незрелых опухолей в прогнозе результатов лечения, поэтому при определении уровня лечебного патоморфоза повсеместно пользуются схемой, разработанной ещё в семидесятых годах прошлого столетия Г.А. Лавниковой, используемой для оценки лучевого патоморфоза, не внося в неё коррективов, которые дают современные методы. На наш взгляд первоочередной задачей является определение прогностической значимости возникающих изменений в опухолях и составление алгоритма оценки результатов химиотерапевтического воздействия на основе морфологических и морфометрических методик, используя как традиционные способы исследования, так и инновационные.

Располагая солидным опытом изучения лучевого, термолучевого и спонтанного патоморфоза злокачественных опухолей, мы считаем, что протокол исследования должен включать не только качественную, но и количественную морфологическую оценку состояния паренхимы, экстрацеллюлярного матрикса с учетом структурных особенностей новообразований и выделением спектра достоверно прогностически значимых критериев. В качестве примера предлагаем результаты изучения термолучевого патоморфоза карцином молочной железы. Переводя полученные результаты в практическую плоскость, были разработаны карты определения патоморфоза с учетом критериальных параметров прогноза. Так, при определении степени патоморфоза в инфильтрирующих протоковых карциномах молочной железы при использовании предоперационной терморadioтерапии с включением в схему лечения интерстициальной локальной ВЧ-гипертермии, целесообразно учитывать следующие критерии: общее количество раковых клеток с экспрессией *p53*, количество клеток с умеренной экспрессией *p53*, количество клеток со слабой, умеренной и высокой экспрессией *bcl2*, общее число раковых клеток с экспрессией антигена PCNA, число раковых элементов со слабой и умеренной экспрессией PCNA. Учитывая роль гемодинамических и гемореологических расстройств как одного из узловых звеньев морфогенеза патоморфоза инфильтрирующих протоковых карцином молочной железы в условиях терморadioтерапии, на наш взгляд, введение этого показателя в комплекс пара-

Итак, количественные критерии степеней термолучевого патоморфоза инфильтрирующих протоковых карцином молочной железы следующие (см. таблицу):

Таким образом, переходя в плоскость оценки эффективности химиопрепаратов, из приведенного примера следует, что данные, получаемые в итоге определения прогностической значимости возникающих изменений в опухолях в сочетании с алгоритмизацией

оценки результатов химиотерапевтического воздействия на основе морфологических и морфометрических методик предоставят возможность осуществления индивидуального прогнозирования и оценки эффекта терапии на основе ближайших результатов лечения, что позволит оптимизировать моделирование дальнейшей тактики терапии больных и, следовательно, повысить эффективность лечения.

Критерии	Степени патоморфоза			
	I	II	III	IV
Общее количество раковых клеток, экспрессирующих <i>p53</i> (%)	38–48	49–56	57–68	69 и выше
<i>n</i> раковых клеток с умеренной экспрессией <i>p53</i> (%)	6,1–10	11–17	18–24	25 и выше
<i>n</i> раковых клеток со слабой экспрессией <i>bcl2</i> (%)	9–12	13–16	17–19	20 и выше
<i>n</i> раковых клеток с умеренной экспрессией <i>bcl2</i> (%)	27–23	22–20	19–17	16 и ниже
<i>n</i> раковых клеток с высокой экспрессией <i>bcl2</i> (%)	59–45	44–37	36–24	23 и ниже
общее <i>n</i> раковых клеток, экспрессирующих PCNA (%)	63–53	52–40	39–26	25 и ниже
<i>n</i> раковых клеток со слабой экспрессией PCNA (%)	7,2–15	16–21	22–28	29 и ниже
<i>n</i> раковых клеток с умеренной экспрессией PCNA (%)	29,3–22	21–14	13–8	7 и ниже
S зон гемодинамических и гемореологических расстройств (%S ракового узла)	5–15	16–20	21–25	26 и выше

Е. Н. Филатова, В. В. Новиков, И. М. Солопаева

ВЛИЯНИЕ ХГ НА СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ЖИВОТНЫХ-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ

НГМУ им. Н. И. Лобачевского, Н. Новгород

Цель исследования. Изучить влияние хорионического гонадотропина на популяционный состав мононуклеарных клеток периферической крови крыс-носителей ЛСП.

Материалы и методы. Эксперимент поставлен на 50 самцах белых беспородных крыс массой 180–200 гр., которым подкожно вводили клетки опухолевого штамма ЛСП.

Популяционный состав мононуклеарных клеток периферической крови крыс оценивали методом непрямой иммунофлюоресценции с помощью МКА ИКО-101 против CD4–АГ крыс и ИКО-109 против антигенов II класса главного комплекса системы гистосовместимости крыс.

Результаты.

1. На десятые сутки развития ЛСП в периферической крови крыс, не получавших ХГ, наблюдалось достоверное снижение относительного количества CD4⁺ мононуклеарных клеток (в 3,6 раза на десятые сутки развития опухоли) и достоверное повышение по сравнению с нормой относительного содержания мононуклеарных клеток крови, несущих на поверхности антигены гистосовместимости II класса (RT-Ia⁺ клеток) (в 2,0 раза на десятые сутки развития ЛСП).
2. У животных-опухоленосителей, получавших по 75; 150 или 1000 ЕД ХГ, на третьи сутки наблюдалась тенденция к нормализации содержания тестированных клеток, а на десятые сутки относительное количество CD4⁺ и RT-Ia⁺ клеток в периферической крови нормализовалось.

Выводы. Показана способность ХГч в определенных дозах – 1000; 150 и 75 ЕД – нормализовывать сниженное под воздействием выраженного онкоиммунодефицита относительное содержание CD4⁺ клеток периферической крови крыс, а также способность ХГч нормализовать повышенное в результате развития новообразования относительное содержание RT-Ia⁺ клеток в периферической крови крыс с ЛСП.

А. А. Фильченков¹, М. П. Завелевич¹, В. В. Семенов², М. Н. Семенова³, Д. Ю. Блохин⁴

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АПОПТОЗ-ИНДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ИНГИБИТОРОВ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ ТУБУЛИНА ДЛЯ КЛЕТОК *JURKAT*

И ИХ РЕЗИСТЕНТНОГО КЛОНА *JURKAT/A4*

¹ИЭПОР им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев

²ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва

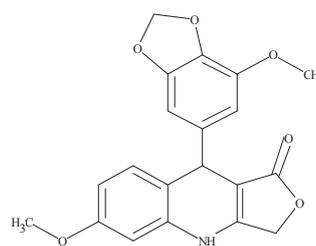
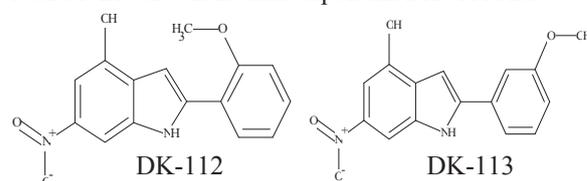
³ИБР им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

⁴РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАН, Москва

Введение. Известно, что ингибиторы полимеризации тубулина обладают противоопухолевой активностью. Несмотря на то, что дестабилизаторы тубулина уже широко используются в онкологической практике, поиск новых оригинальных препаратов этого класса остается актуальным направлением экспериментальной ХТ. Интересным является и вопрос о том, в какой степени опухолевые клетки могут быть резистентными к таким соединениям.

Цель исследования. Сравнительный анализ чувствительности к синтетическим ингибиторам полимеризации тубулина злокачественных лимфоидных клеток *Jurkat* и клональной линии *Jurkat/A4*, обладающей множественной лекарственной резистентностью.

Материалы и методы. Производные 6-нитроиндолов (DK-112 и DK-113) и азааналог подофиллотоксина NMR/19217524 были синтезированы в ИОХ РАН.



NMR/19217524

По данным ^1H -ЯМР (500 Мгц) их чистота составляет не менее 98%. Клональная линия *Jurkat/A4* была получена в РОНЦ РАМН (патент РФ №2267532), а клетки *Jurkat* – из банка клеточных линий ИЭПОР НАНУ. Уровень апоптоза и распределение клеток по фазам клеточного цикла определяли с помощью цитофлуориметра FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Активность препаратов сравнивали с таковой подофиллотоксина (Aldrich, США).

Результаты. Ранее было показано, что производные 6-нитроиндолов и аналог подофиллотоксина блокируют деление клеток эмбрионов морского ежа за счет дестабилизации тубулина.

В настоящих исследованиях эффективность торможения роста клеток *Jurkat* этими соединениями существенно различается.

Так, производные 6-нитроиндолов в концентрациях вплоть до 5 мкмоль/л практически не изменяют кинетики роста клеток, при повышении концентрации замедляют пролиферацию, и только в концентрациях 40 мкмоль/л и выше проявляют токсические эффекты.

В то же время цитотоксичность азааналога подофиллотоксина для клеток *Jurkat* оказалась не ниже, чем у подофиллотоксина. Препарат обладает выраженной токсичностью в концентрациях от 50 нмоль/л, индуцируя при этом апоптоз в 15–20% клеточной популяции и полную гибель клеток на 2–3 сутки, в зависимости от концентрации.

При сопоставимой величине апоптотического индекса при действии подофиллотоксина или его аналога в резистентных клетках *Jurkat/A4*, тем не менее, отмечается лишь прекращение пролиферации и гибель части клеточной популяции, причем с повышением концентрации препарата дозозависимости гибели клеток не наблюдается. В дозах, вызывающих гибель клеток *Jurkat* и индукцию апоптоза в части клеточной популяции, как производные 6-нитроиндолов, так и аналог подофиллотоксина снижают содержание клеток в фазе S при увеличении содержания клеток в фазах G_0/G_1 и G_2/M . В то же время в клетках *Jurkat/A4* действие подофиллотоксина или его азааналога приводит к практически полному блоку цикла (свыше 80%) в фазе G_2/M .

Выводы. Синтетические ингибиторы полимеризации тубулина являются индукторами апоптоза как в клетках *Jurkat*, так и в клональной линии *Jurkat/A4*, обладающей множественной лекарственной резистентностью. Тем не менее, клетки *Jurkat/A4* обнаруживают резистентность и в отношении соединений этого класса. Цитотоксичность и апоптоз-индуцирующая активность производных 6-нитроиндолов на несколько порядков ниже, чем у подофиллотоксина и его аналога. Представляется перспективным сравнительное изучение соединений разной химической структуры, обладающих активностью дестабилизаторов тубулина, как для поиска новых противоопухолевых веществ, так и для выяснения механизмов перекрестной лекарственной резистентности.

Издание 2-е, переработанное и дополненное

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ



Готовится к печати
Издательская группа РОНЦ

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ХИМИОТЕРАПИЯ

С.М. Адекенов

РАСТЕНИЯ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИСТОЧНИКИ НОВЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ АО МНПХ «Фитохимия», Казахстан, Караганда

Нами проведено выделение суммы экстрактивных веществ из 160 видов и эфирных масел из 105 видов растений флоры Казахстана и изучена их противоопухолевая активность.

По результатам скрининга выраженной цитотоксической активностью в отношении личинок морских рачков *Artemia salina* (Leach) обладают эфирные масла из растений блошицы простертой, войлочника хлопковидного, иссопа остроплодного, кахриса Гердера, котовника украинского, пижмы ультауской, полыни белоземельной, тимьяна частолистного, т. Дмитриевой, т. Маршала, т. обыкновенного, шлемника почтизернистого, шульци косматой, ферулы татарской, суммы экстрактивных веществ из аконита белоугого, а. противоядного, живокости илийской, рябчика малого, которые могут быть перспективными источниками для создания препаратов противоопухолевого действия.

Исследование противоопухолевой активности суммы экстрактивных веществ проводили на белых беспородных мышах и крысах с перевиваемыми опухолями: лимфосаркомой Плиса, карциносаркомы Уокера, карциномой Герена, саркомой 45, саркомой М-1, РМЖ РМК-1, солидной опухолью Эрлиха, альвеолярным раком печени РС-1, саркомой 37, саркомой 180, лейкемией Р-388 УСПХ и лейкемией L-1210. При этом определено, что суммы экстрактивных веществ из василька ложнопятнистого, в. русского, гайлардии крупноцветковой, девясилы каспийского, д. высокого, наголоватки многоцветковой, пижмы Киттарианской, п. сантолиной, п. улутауской и п. обыкновенной, полыни гладкой, п. тонковатой, п. широколистной, п. селитряной, п. мелкоцветковой, п. сантолинолистной, п. шелковистой, тысячелистника азиатского, т. мелкоцветкового, т. обыкновенного, т. благородного, скерды кровельной, стизолофуса бальзамического, хартолеписа среднего ингибируют рост штаммов лимфосаркомы Плисса, саркомы 180, опухоли Эрлиха, карциносаркомы Уокера, саркомы 37 на 48-77%.

Как перспективные источники новых противоопухолевых соединений определены растения 28 видов сем. Астровых (Сложноцветных), 3 видов сем. Лютиковых, 7 видов сем. Губоцветных, 3 видов сем. Зонтичных и 1 вида сем. Лилейных, произрастающие на территории Казахстана. При этом следует отметить, что противоопухолевая активность не является исключительным свойством определенных таксонов.

Алясова А.В.¹, Конторщикова К.Н.¹, Сазанов А.И.¹, Пименов В.Г.²

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НЕКОТОРЫХ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЖИВОТНЫХ-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ ХИМИОТЕРАПИИ И ОЗОНОТЕРАПИИ

¹НГМУ

²Институт химии высокочистых веществ РАН, Москва

Цель исследования. Выявить влияние цитостатиков и низких концентраций озонированного физиологического раствора (ОФР) на содержание цинка, меди, железа в плазме крови больных РМЖ и в тканях экспериментальных животных-опухоленосителей.

Материал и методы. Под наблюдением находилось 142 больных РМЖ в возрасте 35–65 лет с гистологически доказанным диагнозом заболевания. Преобладали женщины с III–IV стадиями РМЖ (82,3% – 117 человек). Все пациентки получали стандартное противоопухолевое лечение. 48 больным III–IV стадиями, после подписания информированного согласия, дополнительно проводились инфузии ОФР по методу, разработанному авторами (патент №2207862 от 10.07.03). Экспериментальная часть исследования выполнена на 80 лабораторных животных. Содержание цинка, меди, железа оценивалось в плазме и тканях различных органов (сердце, печень, почки, легкие, мозг, опухоль). Работа выполнена с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества. Для определения содержания микроэлементов использовался метод атомно-эмиссионной спектрографии. Полученные результаты были обработаны с помощью пакета статистических программ STATISTICA 6.0.

Результаты. Установлено, что ПХТ способствовала значимому уменьшению уровня цинка и достоверному возрастанию содержания железа в плазме крови больных. Добавление к стандартному лечению ОФР сопровождалось значимым увеличением сывороточного содержания цинка и снижением концентраций меди и железа. Выявленные изменения ассоциировались с увеличением общей и безрецидивной выживаемости в этой группе.

Введение доксорубина животным-опухоленосителям сопровождалось достоверным уменьшением концентраций микроэлементов в тканях по сравнению с показателями интактных особей. Применение ОФР совместно с доксорубином способствовало уменьшению степени выраженности металлодепрессивного действия препарата.

Таким образом, совместное использование цитостатиков и низких концентраций озонированного физиологического раствора способствовало перераспределению содержания цинка, меди, железа в организме больных РМЖ и животных-опухоленосителей.

Бадун Г.А.², Будько А.П.¹, Дейчман З.Г.¹, Колесникова Е.Ю.¹, Чернышева М.Г.²

ЦИФЕТРЕЛИН – СИНТЕЗ МЕЧЕНОГО ПРЕПАРАТА И ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ ФАРМАКОКИНЕТИКИ

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Введение. Цифетрелин – пентапептид, аналог гипоталамического гормона соматостатина, отобран по результатам изучения гормональной, цитотоксической и противоопухолевой активности для доклинического изучения. Ранее оптимизирован метод синтеза и наработано несколько серий Цифетрелина, на основе которых разработан проект ФСР на субстанцию, и создана модель лекарственной формы для перорального применения.

Цель работы. Выполнение этапа доклинического изучения по созданию отечественного противоопухолевого препарата – синтез меченого препарата и изучение его выведения из организма мышей.

Материалы и методы. Радиоактивную метку в Цифетрелин вводили с помощью метода термической активации трития. Для очистки меченого препарата использовали пластинки ТСХ Silufol UV-254 и жидкостной хроматограф HP 1050, Hewlett-Packard, США.

Изучение выведения Цифетрилина после перорального введения в дозе 10 мг/кг проводили на 5 мышцах-самках СВА. Кал и мочу собирали отдельно, за периоды 0–5; 5–24; 24–48; 48–72 ч. Аликвоты обработанных мочи и кала анализировали в 3 повторностях. Радиоактивность образцов измеряли в сцинтилляционной жидкости «Ultima gold», Perkin Elmer, на счетчиках 1219 Rack Beta, LKB Wallac.

Результаты. Ранее было показано, что радиохимический выход меченого Цифетрилина оказался низким (1–2 %), а отделение целевого продукта от радиоактивных примесей затруднено из-за того, что при обработке вещества потоком атомов трития происходит отщепление защитных групп, и главное, разрыв связи C-S в остатке цистеина. Для увеличения радиохимического выхода меченого продукта тритиевую метку вводили в тетрапептид, а затем проводили стадию химического синтеза меченого тетрапептида с цистеином. Изучение выведения [³H]-Цифетрилина показало, что с калом выводится более 78%, а с мочой – около 16% введенной дозы. Необходимо отметить снижение подвижности, потребления корма и воды, а также падение веса у животных (на 3 г) во время проведения эксперимента, что, вероятно, обусловлено действием препарата.

Выводы: кумулятивная экскреция ³H-соединений с мочой и калом мышей после однократного перорального введения [³H]-Цифетрилина в дозе 10 мг/(188 мкКи кг) составляет 16% и 78% соответственно, при этом основные процессы выведения заканчиваются к 24 часам наблюдения (с мочой выводится около 13% от введенной дозы, с калом – более 72%).

¹Т.Н. Богатыренко, ¹Т.А. Сашенкова, ²Л.М. Байдер, ²З.В. Куроптева, ¹Н.П. Коновалова

ПОВЫШЕНИЕ ХЕМОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА ГИДРОКСАМОВЫХ КИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА

¹ИПХФ РАН, Черногоровка
²ИБФ им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

Введение. В последнее время в качестве важного звена в противораковой терапии рассматривают ингибиторы СОХ. Выбор обусловлен вовлечением этих ферментов во все основные события канцерогенеза. Одним из перспективных классов соединений, обладающих определенными преимуществами перед традиционно рассматриваемыми ингибиторами СОХ (НСПВС), являются гидроксамовые кислоты (ГК).

Усиление хемосенсибилизирующих свойств ГК с помощью доноров NO – новый перспективный путь получения эффективных лекарственных средств, способных усиливать противоопухолевые свойства известных цитостатиков и не обладающих ulcerогенным эффектом.

Материал и методы. Противоопухолевую активность изучали на лимфолейкозе Р-388 мышей линии ВDF₁. Критерием эффективности лечения служило увеличение продолжительности жизни и число излеченных животных.

Исследуемые соединения вводили внутривенно 7-кратно в дозе 40 мг/кг, сначала NaNO₃, через 10 минут производные гидроксамовых кислот (аспарагилгидроксамовой и салицилгидроксамовой). Циклофосфан в дозе 20 мг/кг вводили двукратно на 1-е и 6-е сутки после перевивки опухоли.

Задачи исследования. Изучение влияния на противоопухолевую активность сочетанного действия NaNO₃ и комбинации циклофосфана с производными гидроксамовых кислот.

Результаты. Известно, что в основе механизма действия нитратов и нитритов лежит реакция превращения ионов NO³⁻ и NO²⁻ в оксид азота (NO), который повышает цитотоксичность ряда химиотерапевтических препаратов, в частности, алкилирующих. Предполагают, что сенсбилизация, опосредованная NO, вызывается усилением ингибирования ферментов, участвующих в репарации ДНК.

Продолжительность жизни животных при комбинированном введении циклофосфана и нитрата натрия увеличивалась на 30% по сравнению с монотерапией циклофосфаном. Ранее нами было показано, что в биологических системах производные гидроксамовых кислот, которые мы включили в исследуемую комбинацию, не являются эффективными донорами NO и не обладают противоопухолевой активностью, но при сочетанном введении с циклофосфаном оказывают определенный хемосенсибилизирующий эффект.

Продолжительность жизни животных увеличивается на 40% при комбинации циклофосфан-аспарагилгидроксамовая кислота и на 70% при комбинации циклофосфан – салицилгидроксамовая кислота по сравнению с монотерапией циклофосфаном. Комбинации исследуемых производных гидроксамовых кислот с нитратом натрия не проявили противоопухолевой активности. Усиление генерации NO при сочетанном введении циклофосфана, гидроксамовых кислот и нитрата натрия, кроме увеличения продолжительности жизни приводит к 40 %-ному излечиванию животных при уменьшении терапевтической дозы циклофосфана в 6 раз.

Выводы. Показана возможность повышения эффективности химиотерапии циклофосфаном через сенсбилизацию гидроксамовыми кислотами, усиленную донором оксида азота. Сенсбилизация, опосредованная гидроксамовыми кислотами и оксидом азота, позволяет резко снизить токсичность цитостатика, добиться увеличения продолжительности жизни и числа излеченных животных.

Т.Г. Боровская, В.Е. Гольдберг,
Полужикова М.Е., Пахомова А.В.,
Щемерова Ю.А., Перова А.В., Румпель О.А.
**ОТДАЛЕННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ
ЦИТОСТАТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ
РАЗНЫХ ГРУПП
НА РЕПРОДУКТИВНУЮ ФУНКЦИЮ
И ПУТИ ИХ СНИЖЕНИЯ**
НИИ фармакологии СО РАМН, Томск

Задачи исследования: Проведение в эксперименте сравнительной оценки отдаленных последствий воздействия на репродуктивную систему цитостатических препаратов с разным механизмом действия.

В задачи исследования входило выяснения вопроса о том, какие из них приводят к бесплодию, с чем связано его появление и возможно ли его предотвратить.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 400 крысах (самках, самцах) популяции Вистар. Состояние репродуктивной системы оценивали через 3 и 6 мес. после введения антрациклинов, платиноидов, таксанов, ингибиторов топоизомеразной активности. Определяли способность к спариванию, к зачатию, возможность сохранения беременности, проводили гистологическое исследование гонад, у крыс-самцов изучали показатели спермограммы.

В качестве средств фармакорекции использовали антиоксиданты; гормональные препараты, препараты, активирующие андрорецепторы, а также средства фармакотерапии, активизирующие процессы регенерации гонад.

Результаты. Установлено, наступления стерильности у крыс-самцов и ранней менопаузы у крыс-самок следует ожидать, прежде всего, на фоне использования антрациклиновых антибиотиков. Учитывая, что в онкологической практике, в ряде случаев, существует возможность модификации химиотерапии, то одним из путей борьбы с бесплодием может быть использование менее токсичных в этом плане препаратов. Результаты исследований показали, что из числа гормональных средств, оказывающих защитное действие на яичники, наиболее эффективными являются эстроген-гестагенные препаратами, по сравнению с антагонистами гонадотропин рилизинг-гормона. Выявлено, что препараты синтетического и природного происхождения, обладающие антиоксидантными свойствами, препараты природного происхождения, активизирующие андрорцепторы, снижают гонадотоксичность антибластомных средств. При поиске средств защиты от мужского бесплодия установлено, что к числу таковых могут принадлежать средства фармакотерапии, стимулирующие процессы репаративной регенерации тестикулярной ткани в целом.

Выводы. Степень выраженности гонадотоксичности зависит от вида цитостатического воздействия. Одним из путей борьбы с бесплодием, вызванным цитостатическим воздействием, может быть использования менее токсичных цитостатических и препаратов средств фармакотерапии.

*Боровская Т.Г., Щемерова Ю.А.,
Полужктова М.Е., Пахомова М.Е.,
Перова А.В., Румпель О.А., Гольдберг В.Е.*

**КОРРЕКЦИЯ
НАРУШЕНИЙ СПЕРМАТОГЕНЕЗА,
ВЫЗВАННЫХ
ЦИТОСТАТИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ
НИИ фармакологии СО РАМН, Томск**

В настоящее время в связи с обнадеживающими результатами лекарственного лечения целого ряда онкологических заболеваний возрастает интерес к проблеме бесплодия, как к одному из последствий цитостатической химиотерапии. Установлено, что вклад в токсичность противоопухолевых препаратов вносит индуцируемое ими усиление процессов перекисного окисления липидов. Для снижения токсичности цитостатических препаратов могут применяться антиоксиданты, безопасность использования которых в онкологической практике является доказанной. К числу препаратов такого плана относится экстракт левзеи сафлоровидной (ЭЛС).

Задача исследования. Изучить возможность коррекции гонадотоксических эффектов цитостатического препарата вепезид, обладающего выраженным повреждающим действием на сперматогенез, с помощью экстракта левзеи сафлоровидной.

Материалы и методы. Вепезид вводили крысам линии Вистар однократно, внутривенно в МПД равной 30 мг/кг. ЭЛС – внутривенно в дозе 1 мл/кг за 5 дней до и после введения цитостатического препарата. Состояние сперматогенеза оценивали на 2; 16; 36 и 90-е сутки после введения вепезида по следующим показателям: общее количество сперматозоидов (ОКС), процент их патологических форм (ППФ), количество канальцев со слущенным эпителием.

Результаты. Введение вепезида вызывало снижение ОКС во все сроки исследования (на 40–75 % по сравнению с интактными животными), которое было максимально выражено на 36-е сутки опыта. Отмечалось также достоверное возрастание ППФ спермиев (более чем в 2 раза) с 16 по 36-й дни экс-

перимента и увеличение количества канальцев со слущенным эпителием на 16-е сутки опыта. При сочетанном введении вепезида и ЭЛС ОКС оказалось статистически значимо выше с 16 по 36-й день опыта на 40 – 50 %, снижался также ППФ сперматозоидов и количество канальцев со слущенным эпителием по сравнению с таковым при введении одного вепезида. Количество канальцев со слущенным эпителием на 16-е сут опыта уменьшалось в 2 раза, ППФ – в 2,5 раза.

Вывод. ЭЛС может быть использован в качестве средства для профилактики и коррекции нарушений сперматогенеза, вызванных цитостатическим воздействием.

Бочарова О.А.
**ВЕРОЯТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ
ФИТОАДАПТОГЕНОВ
РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**

Становится очевидной проблема повышения эффективности противоопухолевой терапии и разработки патогенетически обоснованных методов лечения онкологических заболеваний в том числе с использованием биотерапевтических подходов. Вместе с тем актуальна профилактика онкологической заболеваемости в целом, а также рецидивов и метастазов после специального лечения злокачественных новообразований. Учитывая, что ключевым механизмом процессов старения и опухолеобразования может быть нарушение адгезионных взаимодействий (и как следствие – дисдифференцировка), рак можно рассматривать как стремительное старение клеток органа. Вместе с тем существует прямая зависимость частоты возникновения опухолей от скорости старения популяции. Поэтому применение фитоадаптогенов-геропротекторов в онкологии можно считать оправданным. Фитоадаптогены обладают комплексным характером действия на организм. Являются антимутагенами, усиливая, в частности, корректорную активность ДНК-полимеразы. Являются иммуномодуляторами; индуцируют выработку интерферона; повышают содержание ИЛ-12, стимулируя НК-клетки и макрофаги; снижают уровень ИЛ-10, снимая его супрессивные эффекты в отношении клеточного звена иммунитета; подавляют содержание ИЛ-6, ослабляя каскацию у онкобольных. Обладают антистрессорной активностью, снижая образование кортизола и аденокортикотропного гормона при стрессе. Повышают вместе с тем уровень естественных антидепрессантов – эндорфинов, дофамина. Являясь антиоксидантами, снижают образование в организме, в частности МДА, активизируют ферменты антиоксидантной защиты (СОД, каталазы и др.). Связываясь с белком множественной лекарственной устойчивости, который “выкачивает” из опухолевой клетки токсины, способствуют накоплению цитостатиков в опухолевых клетках, тем самым повышая эффективность ХТ. Ингибируют теломеразную активность и индуцируют апоптоз опухолевых клеток. Обладают антиангиогенным действием на опухоль. Являясь индукторами дифференцировки, адаптогены снижают темпы пролиферации опухолевых клеток. Вместе с тем усиление на опухолевых клетках экспрессии адгезивных лигандов для эффекторов иммунитета вызывает лизис последними клеток мишеней, ослабляя “ускользание” опухоли от иммунологического надзора. Создание лекарств-регуляторов на основе фитоадаптогенов перспективно для профилактики и лечения злокачественных новообразований, а также болезней старения.

Бочарова О.А., Лыженкова М.А., Карпова Р.В., Ильенко В.А., Чулкова С.В., Клименков А.А.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С РАСПРОСТРАНЕННЫМ РАКОМ ЖЕЛУДКА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КОМПЛЕКСНОГО ФИТОАДАПТОГЕНА

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Задачи исследования. Определение содержания цитокинов в сыворотке крови пациентов с распространенным раком желудка, получавших комплексный фитодаптоген ФМ-40 на фоне хирургического лечения.

Материалы и методы. ФМ-40 включает компоненты 40 фитоекстрактов, сертифицирован в качестве парафармацевтика. Показан лечебный эффект ФМ-40 в отношении ДГПЖ, лейкоплакии слизистой оболочки полости рта, распространенного РЖ. У пациентов с РЖ IV стадии, принимавших ФМ-40, выявлено снижение уровня опухолевых маркеров; повышенного уровня стресс-гормона кортизола; отмечена нормализация иммунного и антиоксидантного статуса; продолжительность жизни больных возросла в 2,5 раза (до 14–15 месяцев); больные принимали ФМ-40 в предоперационный период (7 дней), а также после операции курсами (1,5 мес) – в среднем 3–4 курса; уровень цитокинов ИФН- γ , ИЛ-12, ИЛ-6 и ИЛ-10 в сыворотке крови определяли за 7 дней до и через 4–5 месяцев после операции. **Результаты.**

У больных распространенным РЖ на фоне приема ФМ-40 выявлено повышение уровня ИФН- γ ($p < 0,05$) и ИЛ-12 ($p < 0,05$), снижение содержания ИЛ-6 ($p < 0,05$) и ИЛ-10 ($p < 0,05$). ИЛ-12 является фактором созревания цитотоксических лимфоцитов, активизирует НК-клетки и макрофаги, а также выработку ИФН- γ . Возрастание ИФН- γ обеспечивает провоспалительную стимуляцию, что способствует увеличению активности макрофагов и НК-клеток в отношении опухоли. Полученные данные согласуются с ростом числа Т и НК-клеток, а также клеток с рецепторами лейкоцитарных интегринов (в том числе макрофагов). Вместе с тем известно, что уменьшение уровня ИЛ-10 снижает ингибирование активности клеточного звена иммунитета при опухолевом росте, что коррелирует с изменением показателей иммунного статуса. Подавление концентрации ИЛ-6, вероятно, способствует снижению степени распада мышечных белков, что может ослаблять симптомокомплекс кахексии у онкологических больных. Данные результаты согласуются с нормализацией аппетита, сна и работоспособности пациентов.

Выводы. Повышение уровня ИФН- γ и ИЛ-12 под влиянием ФМ-40 может активизировать противоопухолевый ответ организма, снижая иммуносупрессивные эффекты ИЛ-10 и кахектическое воздействие ИЛ-6. Полученные результаты согласуются с биологическими и клиническими эффектами у больных распространенным РЖ на фоне приема ФМ-40.

Н.А. Брусенцов¹, Ю.А. Пирогов², Т.Н. Брусенцова³, П.И. Никитин³, М.П. Никитин³, Т.И. Ксенович³, В.А. Полянский⁴, И.С. Голубева¹, М.В. Гуляев², Д.А. Тищенко², А.В. Иванов¹.

ВЫЯВЛЕНИЕ СОСУДОВ, ПИТАЮЩИХ ОПУХОЛЬ

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

²НЦМТС МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

³ИОФ им. А.М. Прохорова РАН, Москва

⁴НИИМ МГУ, Москва

Задача исследования. В/в введение традиционных противоопухолевых препаратов (ТПП) лишь тор-

мозит распространение злокачественных опухолей в организме больного. Чтобы помочь больному справиться с такими опухолями, успешно используются: направленная регионарная внутриартериальная доставка комбинаций ТПП с магнитоуправляемыми противоопухолевыми нанопрепаратами и регионарная гипертермия; хирургические методы и биотерапия с другими терапевтическими воздействиями. Основные усилия при этом направлены на оптимизацию способов раннего выявления сосудов, питающих опухоли.

Материалы и методы. Декстранферрит (ДФ) синтезировали из наночастиц Fe_3O_4 и декстрана. Золи ДФ в разных дозах были испытаны в качестве T_2 и T_2^* -взвешенных негативных МРТ контрастных нанопрепаратов при визуализации: сосудов, питающих капсулу и опухоль, крови, направляющейся по сосудам к капсуле, текущей в капсуле и сосудах опухоли, таргетинга для подтверждения корректности доставки и распределения нанопрепаратов в опухоли при аденокарциноме молочной железы Ca 755 самок мышей C57Bl/6j с опухолями объемом от 40 до 420 мм³. В период от 3 часов до 30 часов до проведения МРТ сканирования внутривенно вводили 0,02–0,2 мл 10 %-ного золя ДФ в полиглюкине. ДФ повышал контраст изображений органов и тканей, структур капсулы и сосудов, питающих опухоль.

Результаты. При внутривенном введении ДФ с дополнительной инъекцией магневиста и последующим T_2 -, T_2^* -взвешенным 3D-сканированием получены усиленные МРТ-изображения, на основании которых определены расположение и функциональное состояние поверхностных и других сосудов, питающих капсулу и опухолевые ткани.

Выводы. Разработан способ выявления сосудов, питающих опухоль, в эксперименте.

В.М. Бухман, Э.Р. Переверзева, И.Д. Трещалин, Е.Б. Исакова, Е.Н. Олсуфьева,

А.Н. Тевяшова, М.Н. Преображенская

НОВОЕ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКОЕ ПРОИЗВОДНОЕ АНТИБИОТИКА КЛАССА АУРЕОЛОВОЙ КИСЛОТЫ

НИИ НА им. Г.Ф. Гаузе РАМН, Москва

Задачи исследования. В лаборатории химической трансформации антибиотиков НИИ НА им. Г.Ф. Гаузе был синтезирован ряд производных aureоловой кислоты. В опытах *in vitro* на клетках РТК линии *HCT 116* была оценена их антипролиферативная активность. Соединение ЛХТА-1599 было отобрано, как активное (IC_{50} составила 120 нМ). Задачей настоящего исследования явилось изучение его противоопухолевой активности *in vivo*.

Материалы и методы. Опыты проведены на самках и самцах мышей $B_6D_2F_1$ m тела 20–22 г. Лимфому Р388 перевивали внутрибрюшинно по 10^6 клеток на мышь в день 0. Рост асцитной лимфомы оценивали по параметру нарастания m тела и по УПЖ животных, %. Меланому В16 и аденокарциному молочной железы АК755 перевивали подкожно по 10^6 клеток на мышь в день 0. Эффект оценивали по ТРО, % в динамике. Соединение ЛХТА-1599 растворяли в изотоническом р-е NaCl и вводили в/в в диапазоне доз. Препаратом сравнения являлся антибиотик того же класса, оливомицин. Лечение начинали на 1 или 3 сутки. О токсичности судили по результатам ежедневного наблюдения, изменению m тела.

Результаты. Всего поставлено 4 опыта: 2 на Р388 и по 1 на солидных АК755 и В16. Показано, что ЛХТА-1599, примененный в/в ежедневно или раз в 3 сут \times 5 раз по 4 мг/кг вызывает достоверное УПЖ животных с лимфомой Р388 (от 39 до 52%).

При применении оливомицина в дозе 2 мг/кг, не вызывающей лекарственной гибели, УПЖ составило 35%. Достоверное торможение роста меланомы мышей В-16 было получено при введении ЛХТА-1599 в диапазоне доз от 4 до 8 мг/кг пятикратно с интервалом 72 часа (максимальное ТРО составляло 100% на 10-17 сут). Оливомицин в этом эксперименте проявил близкую к ЛХТА-1599 противоопухолевую активность в дозе 2 мг/кг. Аналогичные результаты получены на модели АК755.

Выводы. Новое производное ауреоловой кислоты ЛХТА-1599 имеет значительно более широкий терапевтический интервал по сравнению с оливомицином, проявляет противоопухолевую активность в отношении как асцитной, так и солидной опухолей. Выявленная противоопухолевая активность позволяет передать препарат на дальнейшие этапы предклинического изучения.

О.А. Васильев

ЦИАНОСОДЕРЖАЩИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ, АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ЦКБ РАН, Москва

Задача исследования. Поиск новых групп противоопухолевых препаратов.

Материалы и методы. Компьютерная программа для предсказания спектра биологической активности веществ PASS.

Результаты и выводы. Включение в молекулы биологически активных и лекарственных веществ HCN и ее производных позволит создать новые г-группы антиметаболитов, обладающих высокими цитостатическими, антипролиферативными и противовоспалительными свойствами. Предполагается, что после проникновения в клетки вещества, содержащего HCN или ее производные, под воздействием кислот и ферментов может происходить разложение этого вещества на HCN, ее производные и лекарственное или биологически активное вещество.

Цианиды, блокируя цитохромоксидазы, будут вызывать клеточную гипоксию и гибель клеток. При включении синтезированных веществ в цепь биохимических реакций, без их разложения, можно предположить реакции, в результате которых будет тормозиться транспорт РНК, синтез и репликация ДНК, что может инициировать апоптоз.

В частности, бензцианофолат может угнетать дегидрофолат редуктазу, блокируя синтез пуринов. При разложении на C_6H_5CHO , фолиевую и HCN, последняя будет ингибировать цитохромоксидазы, вызывая гипоксию и гибель клеток. Проведенный анализ предполагаемого вещества – бензцианофолата – с помощью PASS показал высокую цитостатическую и противоопухолевую активность:

- Antileukemic – 0,636;
- Cytostatic – 0,631;
- Antineoplastic (colorectal cancer) – 0,574.

Снижение общетоксического действия HCN и ее производных:

- точная дозировка,
- применение антидотов цианидов,
- лечение на фоне:
 - оксигенотерапии,
 - гипербарической оксигенации,
- совершенствование средств доставки
 - липосомы,
 - фуллерены,
 - моноклональные антитела,
- преимущественно локальное, ультраселективное применение.

М.Г. Воронков², Л.А. Островская¹, Д.Б. Корман¹, Н.В. Блюхтерова¹, М.М. Фомина¹, В.А. Рыкова¹, К.А. Абзаева², Л.В. Жилицкая²

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИАКРИЛАТОВ БЛАГОРОДНЫХ МЕТАЛЛОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

¹ИБФ им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

²ИИХ им. А.Е. Фаворского СО РАН, Иркутск

Задачи исследования. Оценка противоопухолевой активности металлополиакрилатов, составляющих новую для онкологии группу соединений, а также в изучении связи «структура – эффект» в ряду производных полиакриловой кислоты, содержащих различные, в том числе благородные (платина, золото, серебро), металлы.

Материалы и методы. Исследована токсичность и противоопухолевая эффективность 14 производных полиакриловой кислоты, содержащих различные металлы. Определены параметры острой токсичности препаратов (LD₅₀ и МПД) при их однократном внутривенном (в/в) введении в диапазоне доз от 10 до 250 мг/кг (мышь BDF₁). Изучена противоопухолевая активность препаратов на моделях солидных опухолей – LLC (мышь BDF₁) и аденокарцинома АКАТОЛ (мышь Balb/c) при ежедневном, пятикратном в/в применении, начиная со следующих суток после перевивки опухоли. Противоопухолевый эффект препаратов оценивался при сопоставлении кинетики развития опухолей в группах леченных и контрольных животных. Показателем ростингибирующей активности соединений служил коэффициент ТРО, %.

Результаты. Установлено, что среди изученных соединений препарат феракрил обладает наименьшей токсичностью (LD₅₀ и МПД составляют 200 и 150 мг/кг, соответственно), а никель- и станнум-замещенные производные проявляют наибольшую токсичность (LD₅₀ и МПД – 15 и 10 мг/кг, соответственно). Среди полиакрилатов благородных металлов наименьшей токсичностью обладает препарат аурумакрил, LD₅₀ и МПД которого равны 150 и 100 мг/кг, соответственно. Эти показатели составляют для платинакрила 75 и 50 мг/кг, для аргакрила 30 и 20 мг/кг. Обнаружено, что полиакрилаты благородных металлов являются наиболее эффективными среди 14 изученных соединений. Аурумакрил ингибирует рост LLC и аденокарциномы АКАТОЛ на 60-65%. Платинакрил тормозит развитие этих опухолей на 40 и 55%, а препарат аргакрил – на 90 и 40% по сравнению с контролем соответственно.

Выводы. Изучение противоопухолевой активности в ряду металлозамещенных производных полиакриловой кислоты на моделях солидных опухолей (LLC и аденокарциномы АКАТОЛ) позволило установить, что полиакрилаты благородных металлов аурумакрил, аргакрил и платинакрил являются наиболее эффективными среди изученных соединений.

И.С. Голубева¹, Н.П. Маркова¹, Ю.Ю. Солуданов², Б.В. Страдомский², Г.К. Герасимова¹

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРЕПАРАТА СТЕЛЛАНИН

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва,

²ООО «Фармпрепарат», Ростов-на-Дону

Введение. Препарат Стелланин (СТ) является комплексным гетероциклическим йодсодержащим соединением, состоящим из 20% 1,3-дизтилбензимидазолия триодида + 80% низкомолекулярного ПВП.

Препарат обладает местной и системной антибактериальной активностью широкого спектра действия, противовоспалительным и регенерирующим действием, а также цитотоксическим действием в отношении культур опухолевых клеток человека. Компоненты препарата образуют прочный комплекс – молекулу Стелланина, из которой происходит постепенное медленное высвобождение йода. Вследствие этого вещество является нетоксичным: ЛД₅₀ для крыс > 10000 мг/кг (Б.В. Страдомский с соавт.).

Задача исследования. Оценка противоопухолевого действия СТ в отношении перевиваемых опухолей мышей.

Материалы и методы. Противоопухолевая активность СТ в лекарственной форме «капли для приема внутрь» изучена на подкожно привитой меланоме В16. Лечение начинали через 48 ч после подкожной перевивки опухоли. Препарат СТ в соответствующем разведении вводили мышам *per os* с помощью зонда. Дозы препарата 10 мг/кг, 25 мг/кг и 50 мг/кг. Лечение проводили в течение 10 дней в двух режимах:

- I. ежедневно 3 раза в сутки с интервалом 3 ч;
- II. 1 раз в сутки ежедневно.

Оценка противоопухолевого эффекта по показателям: ТРО и УПЖ животных, (% от контроля).

Результаты. Капли СТ при введении мышам *per os* тормозят рост подкожной меланомы В16 в зависимости от дозы и режима лечения. Максимальный эффект получен при дозе 50 мг/кг при трехразовом ежедневном в течение 10 дней введении *per os* (курсовая доза 1500 мг/кг): 80% ТРО непосредственно после окончания лечения, 67% через 7 дней после окончания лечения и сохранение более 50% ТРО в течение 13 дней. УПЖ = 15%. При однократном ежедневном введении СТ в той же дозе ТРО на уровне 60–51% сохранялся в течение 13 дней после окончания лечения. ПВП, входящий в состав препарата, не обладает противоопухолевой активностью. Во всех изученных дозах и режимах СТ не стимулировал рост опухолей. Гибели животных от токсичности СТ, т.е. ранее контроля, не наблюдалось.

Заключение. Впервые показана противоопухолевая активность содержащего 1,3-диэтилбензимидазолия трийодид противовоспалительного препарата СТ.

Л.Е. Голубовская¹, Т.А. Титова², В.Н. Толкачев²,
З.С. Смирнова², О.В. Онопченко²,
М.А. Красильников², Т.А. Федотчева³,
Н.Л. Шимановский³, В.М. Ржевников³

ТРАНСФОРМИРОВАННЫЕ СТЕРОИДЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ИНГИБИТОРЫ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ

¹ГУ ЭНЦР, Москва

²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

³РГМУ, Москва

Задачи исследования. Эффективность традиционной адьювантной терапии гормонозависимых опухолей резко падает при возникновении МЛУ, механизмы действия которой могут быть связаны как с активизацией обратного транспорта лекарств, так и с нарушениями апоптоза раковых клеток. Синтез цитотоксических стероидов с широким спектром гормонального действия, включающим антиэстрогены, сильные и слабые эстрогены, позволяет провести поиск потенциальных ингибиторов МЛУ. С этой целью препараты указанных типов гормонального действия, показавшие высокую активность на опухоли Ca 755, были исследованы на линиях клеток РМЖ человека MCF-7, чувствительной к тамоксифену, и двух линиях культуры, одна из которых резистентна к тамоксифену MCF-7/T2, а другая к доксорубину MCF-7/R.

Материалы и методы. Сублиния MCF-7/T2 была получена в результате длительного (60 суток) культивирования родительской линии MCF-7 в среде DMEM в присутствии тамоксифена, а MCF-7/R – в присутствии гентамицина. При определении скорости роста клеток использован МТТ-тест. Накопление и выброс опухолевыми клетками Докс контролировали методом конфокальной лазерной микроскопии на приборе LSM-S-Pascal.

Результаты и выводы. Наиболее выраженный цитостатический эффект на всех линиях MCF-7 обнаружен у антиэстрогеноцитостатика РО-716: 50 % и 76 %-ное подавление клеточного роста на MCF-7/T2 и MCF-7/R соответственно. Препарат обладает также химиосенсибилизирующим действием, усиливая более чем втрое эффект Докс. Он существенно замедляет транспорт Докс из опухолевых клеток: концентрация в них Докс, введенного совместно с РО-716, не изменялась в течение 30 мин, а без него уменьшалась на 13% уже через 15 мин. Препарат РО-720, практически лишенный гормонального действия, превосходит Там на культуре MCF-7/T (60 % против 52), а в комбинации с эстрадиолом – более чем вдвое. Менее активны препараты РО-727 и 731 с высокой эстрогенной активностью, хотя только у последнего зафиксировано усиление цитотоксического эффекта в комбинации с эстрадиолом. Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения стероидных цитостатиков в качестве ингибиторов МЛУ.

С.А. Гончарова, Т.А. Раевская, Н.П. Коновалова, В.Д. Сень

РАЗЛИЧИЯ В СКОРОСТИ РАЗВИТИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ЦИСПЛАТИНУ И ПЛАТИНА(IV)-НИТРОКСИЛЬНОМУ КОМПЛЕКСУ ИПХФ РАН, Черноголовка

Максимальный противоопухолевый эффект цисплатина (комплекс двухвалентной платины Pt(II) недостижим из-за его высокой токсичности и быстрого развития резистентности. Перспективным способом улучшения химиотерапевтических свойств платиновых соединений является введение в их структуру биологически активных лигандов и превращение комплексов Pt(II) в менее реакционноспособные комплексы четырехвалентной платины Pt(IV). Мы синтезировали ряд платина(IV)-нитроксильных комплексов, содержащих биологически активные нитроксильные радикалы. Одним из них является комплекс*:

Ранее мы показали, что комплекс ВС118 проявляет в эксперименте высокую противоопухолевую активность, сравнимую с таковой цисплатина, и менее токсичен. При совместном введении комплекса ВС118 и цисплатина в низких дозах (1/20 от LD₅₀) противоопухолевое действие взаимно усиливается (синергический эффект). В настоящей работе мы исследовали развитие устойчивости лейкоза Р388 к монотерапии цисплатином или комплексом ВС118, а также к комбинированной терапии этими препаратами. Резистентность индуцировали путем последовательной перевивки опухоли от леченных животных.

Все препараты вводили животным на 1; 3; 5 и 7 сутки после перевивки опухоли. В опытах по индукции устойчивости к комбинированной терапии препараты вводили в эти же сроки одновременно и в тех же дозах, что и при индукции устойчивости к монотерапии. На каждой трансплантационной генерации проверяли чувствительность каждого штамма к индуцирующей терапии и к двум другим воздействиям, применяемым в оптимальных дозах.

*BC118[ε-аммин-d-(4-амино-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил)-α,β-бис(ацетато)-β,γ-дихлороплатина(IV)].

Резистентность к цисплатину развивалась к 9 генерации, одновременно снижалась чувствительность штамма к комбинированной терапии, но в течение двух генераций сохранялась чувствительность к ВС118. Устойчивость к комплексу ВС118 развивалась несколько позже – к 11 генерации, но при этом в течение еще четырех генераций сохранялась чувствительность к цисплатину и в течение трех генераций – к комбинированной терапии. Быстрее всего развивалась устойчивость к комбинированной терапии цисплатином и комплексом ВС118 – уже к 7-й генерации, при этом параллельно снижалась чувствительность к монотерапии каждым входящим в комбинацию препаратом. Эти данные предполагают наличие некоторых сходств в механизме развития устойчивости к цисплатину и к комплексу ВС118. Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что комбинированная терапия цисплатином и комплексом ВС118 может быть эффективной для опухолей, которые ранее не подвергались лечению цисплатином.

Дерябина О.Н., Карпова В.Н., Букаева Е.О., Степанова Е.В., Барышников А.Ю., Плотникова Н.А.
ЦЕРВИКОВАГИНАЛЬНЫЕ ИНДУЦИРОВАННЫЕ НЕОПЛАЗИИ: АНГИОГЕНЕЗ, ПАТОМОРФОЛОГИЯ
 ГОУ ВПО «МордГУ им. Н.П. Огарева», Саранск
 РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Цель исследования. Изучение влияния мелатонина и метформина на процессы неоангиогенеза в условиях экспериментального опухолевого роста, индуцированного бенз(а)пиреном.

Материал и методы исследования. Эксперимент был поставлен на 120 самках нелинейных белых мышей в возрасте 3 мес весом 20–22 г., поделенных на 4 группы по 30 животных. Моделирование цервиковагинального канцерогенеза, индуцированного бенз(а)пиреном, производили по стандартной методике. Животные 1 гр. получали с питьевой водой в ночные часы (19.00–07.00) мелатонин по 2 мг/л. Животные 2 гр. получали с питьевой водой в течение всего дня «сиофор 500» по 200 мг/л. Животные 3 гр. получали с питьевой водой в течение всего дня «сиофор 500» по 200 мг/л и мелатонин по 2 мг/л. Животные 4 гр. составили контроль по канцерогену и получали питьевую воду без добавления мелатонина и сиюфора.

Результаты. Под влиянием бенз(а)пирена у мышей развивались опухоли шейки матки с частотой 80 % (24 животных из 30, получавших мелатонин), 67 % (20 животных из 30, получавших метформин), 60 % (18 животных из 30, получавших мелатонин и метформин) и 90 % (27 животных из 30) в контрольной группе.

Вывод. Введение мелатонина и сиюфора способствовало снижению активности ангиогенеза в ткани индуцированных неоплазий. Мелатонин и метформин обладают онкопротекторным действием, что проявляется уменьшением частоты, множественности и размеров опухолей шейки матки.

О.С. Жукова¹, Г.К. Герасимова¹, Ю.Ю. Солуданов², Б.В. Страдомский²

ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРЕПАРАТА СТЕЛЛАНИН

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва,

²ООО «Фармпрепарат», Ростов-на-Дону

Введение. Препарат Стелланин (СТ), разработанный в ООО «Фармпрепарат», является комплексным

гетероциклическим йодсодержащим соединением, состоящим из 20% 1,3-диэтилбензимидазолия трийодида + 80% низкомолекулярного ПВП. У препарата выявлены местная и системная антибактериальная активность широкого спектра действия, противовоспалительное и регенерирующее действие. Компоненты препарата образуют прочный комплекс – молекулу СТ, из которой происходит медленное высвобождение йода с образованием 1,3-диэтилбензимидазолия монойодида. Механизм бактерицидного действия основан на взаимодействии высвобождающегося йода с белками бактериальной стенки и ферментами белками микроорганизмов с образованием йодаминов, что приводит к денатурации белковых молекул. Противовоспалительное и регенерирующее действие СТ связывают с диэтилбензимидазолием, т.к. этими свойствами обладает также соединение – 1,3-диэтилбензимидазолия монойодид, у которого отсутствует противомикробное действие (Б.В. Страдомский и др.).

Задача исследования. Оценка цитотоксического действия субстанции СТ, 1,3-диэтилбензимидазолия монойодид и механизма гибели опухолевых клеток.

Материалы и методы. Культуры опухолевых клеток человека: РТК линии LS174Т и эритробластный лейкоз линии K562. Цитотоксическую активность оценивали МТТ-тестом после 72 ч инкубации при 37 °С (среда RPMI1640, 10 %-ная эмбриональная сыворотка теленка, 5 %-ное содержание CO₂ в атмосфере) по выживаемости клеток в присутствии субстанции СТ или 1,3-диэтилбензимидазолия монойодида в диапазоне концентраций 25 мкМ; 50 мкМ; 100 мкМ и 150 мкМ. Возможность индукции препаратом апоптоза определяли с помощью FLICA Apoptosis Detection Kits.

Результаты. На культуре клеток LS174Т установлена зависимость цитотоксического эффекта от концентрации СТ при его однократном введении в среду инкубации клеток в диапазоне концентраций 20–150 мкМ: IC₅₀=25 мкМ. Максимальный цитотоксический эффект (27–30% выжившей фракции клеток) достигнут при однократном введении препарата в концентрации 100 и 150 мкМ или при десятикратном введении СТ в концентрации 20 мкМ (по 5 раз в день на 1 и 2 сутки инкубации клеток). Механизм гибели клеток – апоптоз. Цитотоксической активности монойодида в диапазоне концентраций 25 – 100 мкМ не выявлено.

Заключение. Противовоспалительный препарат СТ обладает прямым цитотоксическим действием в отношении культур опухолевых клеток человека. Цитотоксическое действие СТ можно связать с выделяющимся из трийодида йодом, но не с бензимидазольной частью молекулы СТ.

Г.И. Кабацкая¹, В.Ф. Левшин², М.Я. Шапкина², В.В. Решетникова², Ю.Н. Соколов², Г.А. Гордина², А.В. Сергеев²

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕПАРАТА «ЧАГОВИТ» В ГРУППАХ РИСКА

¹ГОУ ВПО ММА им. Н.А. Сеченова, Москва

²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Введение. В экспериментальных работах доказано наличие у экстракта чаги (ЭЧ) антиканцерогенных, антимутагенных, иммуномодулирующих, антиоксидантных и других свойств. БАВ в ЭЧ, по-видимому, представлены суммой гуминовых кислот (хромогенным полифенольным комплексом), полисахаридами и другими БАВ. В РОНЦ на основе ЭЧ созданы препараты «Чаговит» (ЧВ) и «Чагалюкс» (ЧЛ).

Цель нашего исследования заключается в оценке возможности использования препарата ЧВ в группах онкологического риска («злостные» курильщики, больные мастопатией) и при лечении больных сахарным диабетом (СД) II типа. Проведены рандомизированные исследования в 3 группах пациентов. I группа – «злостные» курильщики с длительностью курения 5–30 лет (166 человек), желающие отказаться от курения; II группа – больные мастопатией (98 женщин); III группа – больные сахарным диабетом (120 человек). Всем пациентам в опытных подгруппах ЧВ назначали по 2 капсулы 2 раза в день в течение 1–2 мес.

Результаты. Одним из важных факторов риска развития хронических и онкологических заболеваний является курение. При курении возникает привыкание, затрудняющее добровольно отказаться от курения. Применение препарата у курильщиков в течение 1–2 мес. способствовало сокращению числа выкуриваемых сигарет в 1,5 раза по сравнению с контролем. Число лиц, отказавшихся от курения, возросло в 3 раза (30–35% в опытной группе, 10–12% в контроле). У 42–45% лиц улучшалось самочувствие (в контроле у 14–17%). Положительное влияние препаратов чаги у лиц, бросающих курить, по-видимому, обусловлено антитоксическими, адаптогенными, антиоксидантными свойствами препарата, который способствовал более быстрому снятию токсикозов никотинозависимости у курящих, ускорял нормализацию физиологических функций организма. Другой группой риска являются **больные мастопатией**. После 2 мес. применения ЧВ показано, что по эффективности действия ЧВ сопоставим с мастодиномом (одним из наиболее активных препаратов при лечении мастопатии). Он достоверно снимал боли и дискомфорт в молочных железах, предменструальную мастодинию, особенно на фоне астеноневротического синдрома. Отмечалась хорошая переносимость ЧВ. **Больные СД II типа.** СД – одно из наиболее распространенных, хронических заболеваний во всем мире. Основной проблемой СД является значительный риск развития осложнений. Избыточный вес (ожирение) сопутствует более 80% больных СД II типа. В подгруппе пациентов с длительным сроком СД (до 12 лет), имеющим осложнения (80%) и сопутствующие заболевания, в том числе гипертонию и др., ЧВ назначали на фоне гипогликемического лечения (диабетон, маннинил и др.). Через 1 мес. после начала терапии у пациентов наблюдалось достоверное снижение на 15% уровня глюкозы в крови. При этом у 50% пациентов исчезла жажда и сухость во рту, практически у всех наблюдалось повышение общего тонуса, у 33,3% снизился вес. В группе сравнения достоверных изменений не наблюдали. В подгруппе больных с длительностью заболевания менее 5 лет, имеющих меньше осложнений, ЧВ назначали на фоне снижения дозы гипогликемических препаратов на 50%. Уровень глюкозы в крови больных через 1 мес. после начала применения комбинированной терапии снижался на 20%. У 35% пациентов исчезла жажда, у 45% – сухость во рту, 80% больных отмечали повышение общего тонуса, у 10% больных снизился вес. В контроле (традиционная терапия) изменений не наблюдалось. У больных в подгруппе с впервые выявленным СД II типа (без осложнений), ЧВ назначали на фоне диеты № 9 без применения традиционного гипогликемического лечения. В группе больных, получающих ЧВ в течение 1 мес., наблюдали статистически значимое снижение на 40% уровня глюкозы в крови натощак. У 35–40% пациентов исчезла жажда и сухость во рту, у 100% больных повышался общий тонус, у 65% – снизился вес. Все пациенты, получающие ЧВ, отмечали хорошую переносимость препарата и существенное клиническое улучшение состояния здоровья. В контрольной группе положительных изменений не наблюдали.

Выводы. Препараты чаги (ЧВ и ЧЛ) могут быть перспективны для химиопрофилактики рака и при лечении хронических сопутствующих заболеваний (мастопатия, СД II типа).

О.В. Калинина¹, Б.А. Фролов¹, А.А. Штиль², Н.М. Перетолчина², З.С. Смирнова²

МИЛИАЦИН КАК СРЕДСТВО ПОВЫШЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ И СНИЖЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ МЕТОТРЕКСАТА НА LLC МЫШЕЙ

¹ГОУ ВПО ОрГМА, Оренбург
²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Цель исследования. Оценка влияния пентациклического тритерпеноида милиацина на противоопухолевый и токсический эффекты метотрексата на модели карциномы легких Льюиса.

Материалы и методы. LLC перевивали мышам – самцам BDF₁ по 50 мг измельченной опухолевой ткани в 0,5 мл среды 199 подкожно в правую подмышечную область. После трансплантации LLC животные были разделены на четыре группы:

- I. Мыши не леченные (контроль);
- II. Мыши, получавшие внутрибрюшинно однократно МТХ (фирма Эбеве, Австрия) в дозе 10 мг/кг;
- III. Мыши, получавшие МТХ с последующим 3-кратным введением растворителя милиацина – твина-21 в 0,9% растворе хлорида натрия;
- IV. Мыши, получавшие МТХ с последующим 3-кратным введением милиацина.

Лечение начинали через 48 часов после инокуляции опухоли Милиацин и растворитель вводили внутрибрюшинно через 1; 24 и 48 часов после введения МТХ.

Критериями оценки противоопухолевого эффекта служили: торможение роста опухоли (ТРО, %) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) опытных животных по сравнению с контрольными.

Токсичность в леченных группах оценивали по ранней гибели мышей по сравнению с гибелью не леченных животных. Результаты обрабатывали с использованием непараметрического критерия χ^2 и критерия Стьюдента. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. Тритерпеноид растительного происхождения милиацин повышает терапевтическую эффективность МТХ, их сочетанное применение вызывает высокое торможение роста LLC: в течение 12 дней после введения цитостатика ТРО составляет 91–84%, а статистически значимое ТРО сохраняется до 19 дня после окончания лечения (ТРО=60%). Кроме того, МТХ в сочетании с милиацином увеличивает продолжительность жизни мышей с LLC на 36%, в то время как МТХ в монотерапии только на 9%.

Однократное внутрибрюшинное введение МТХ в дозе 10 мг/кг оказывает токсическое действие на мышей BDF₁ с LLC, вызывая гибель 33% животных в течение первых 5 суток после его применения. Милиацин уменьшает токсическое действие МТХ, снижая гибель животных до 13%.

Заключение. Полученные результаты исследования открывают перспективу использования милиацина при комбинированной химиотерапии злокачественных новообразований.

Данные, полученные нами ранее о иммунопротекторном и гепатопротекторном действии милиацина дают основание продолжить исследование по сочетанному применению милиацина с другими противоопухолевыми средствами.

¹Каршиева С.Ш., ¹Райхлин Н.Т., ¹Зимакова Н.И.,
¹Трещалина Е.М., ²Небольсин В.Е.

ВОЗМОЖНОСТИ ЦИТОДИФФЕРЕНЦИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ МЕЛАНОМЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

¹РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва
²ООО «Фарминтерпрайвез», Москва

Введение. Ранее *in vitro* на клетках мышинной меланомы В16 и меланом человека MS и Mel5 было показано, что дикарбамина (Dcg) обладает антипролиферативной активностью, причем проявляет синергизм при сочетании с α -интерфероном. Изучение цитодифференцирующего действия Dcg на меланоме человека Mel6 показало способность интенсифицировать меланиногенез, что послужило основанием для изучения противоопухолевого эффекта этого агента на моделях меланомы *in vivo*.

Цель исследования: изучить возможность цитодифференцирующей терапии с использованием Dcg и его эффективность в сочетании с химиотерапией на моделях меланомы животных и человека.

Материалы и методы: В опытах использованы 3 вида меланом: мышинная меланома В16, меланома человека – пигментированная Mel6 и беспигментная Mel7 (Банк опухолевых штаммов РОНЦ). Опухоли трансплантировали подкожно иммунокомпетентным или иммунодефицитным мышам, соответственно штамму. Dcg фирмы «Валента Фармацевтика», РФ. Для изучения эффективности комбинированной терапии с Dcg использованы стандартные для лечения диссеминированной меланомы аптечные препараты цисплатин (ЦП), дакарбазин (DTIC) и α -интерферон (α -ИФН). Все препараты применены в терапевтических дозах и режимах введения, Dcg в сочетании с α -ИФН и ЦП применяли в субтерапевтической дозе. Об эффективности лечения судили по стандартным критериям: ТРО% или Т/С% и УПЖ%. Для гистохимического определения степени экспрессии аргирофильных белков ядрышек (Ag–ОЯОР–белков) использовали реакцию с нитратом серебра. Интенсивность экспрессии Ag–ОЯОР–белков оценивали по количеству образующихся гранул серебра. Полученные данные обрабатывали статистически с помощью доверительного интервала по методу Стьюдента. Различия считались статистически достоверными при $p \leq 0,05$.

В результате проведенных исследований показано, что:

- Dcg снижает экспрессию Ag–ОЯОР–белков в 2,0–2,5 раза ($p \leq 0,001$) относительно контроля в клетках ксенографтов меланомы человека Mel7, что ведет к снижению скорости прохождения фаз клеточного цикла;
- цитодифференцирующая терапия с использованием Dcg вызывает высокий достоверный ингибирующий эффект на мышинной меланоме В16 (ТРО=69-93%, УПЖ=41%, $p \leq 0,05$);
- эффективность цитодифференцирующей терапии с использованием Dcg на ксенографтах меланомы человека Mel6 и Mel7 ниже значимого уровня (Т/С=51–57%);
- комбинация Dcg+ЦП в сравнении с монохимиотерапией в 2 раза более эффективна по действию на опухолевый узел меланомы В16 (ТРО=85-88%, $p \leq 0,05$) и по выживаемости мышей (УПЖ=38%, $p \leq 0,05$);
- комбинация Dcg+ α -ИФН показала активность по ингибирующему эффекту на Mel6 человека на уровне одного α -ИФН (Т/С=57–60%, $p \geq 0,05$);

- комбинация Dcg+DTIC на Mel7 человека достоверно более эффективна по сравнению с монотерапией по ингибирующему действию (Т/С=3% против 5%, $p \leq 0,05$) и выживаемости мышей (УПЖ=29% против 21%, $p \leq 0,05$);

Заключение. Полученные данные позволяют считать, что двойные комбинации цисплатина и дакарбазина с Dcg перспективны для клинической апробации, т.к. дают возможность получить более высокий терапевтический результат. Комбинация Dcg+ α -ИФН должна быть дополнительно изучена с терапевтической дозой Dcg, т.к. на модели п/к перивитого гемобластома Френд с использованием препарата в более высокой дозе показала синергизм.

А.А. Кладиев, П.М. Бычковский, С.А. Красный, Ю.П. Истомин, Е.Н. Александрова, Т.Л. Юркитович, Н.В. Голуб, В.А. Алиновская, Р.И. Костерова,
ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ГЕЛЕОБРАЗУЮЩЕЙ ФОРМЫ ПРОСПИДИНА НА МОДЕЛЯХ САРКОМЫ М-1 И ЙЕНСЕНА У КРЫС
Учреждение БГУ «НИИ ФХП», Минск
РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, Минск
ООО «Биотехнологическая компания», Москва

Введение. В настоящее время в Российской Федерации выпускается несколько лекарственных форм проспирина, разрешенных для применения в медицинской практике: лиофилизированный порошок для инъекций и мазь с содержанием проспирина 30–50%.

К недостаткам существующих лекарственных форм проспирина следует отнести быстрое исчезновение из крови при внутривенном введении, низкую устойчивость в воде и водных растворах.

Цель исследования. Создание новой лекарственной формы проспирина в виде гидрогеля для локальной терапии различных патологических процессов, обеспечивающей увеличение эффекта противоопухолевого действия цитостатика.

Материалы и методы. Исследования проводили на крысах линии Вистар весом 120–160 г с перевитыми саркомой М-1 и саркомой Йенсена. Эксперименты проводили на 7–10 сутки после перевивки опухоли. В контрольной и опытной группе использовали по 8–10 крыс. Препарат проспирина в инъекционной форме и в виде гидрогелей вводили крысам однократно внутривенно (в объеме 1 или 2 мл на каждые 100 г веса животного). Критериями оценки противоопухолевого эффекта являлись: рост опухоли и продолжительность жизни животных. Объем опухоли (V , см³) рассчитывали по формуле Шрека:

$$V = (a \times b \times c) \times \frac{\pi}{6}, \text{ где}$$

a, b, c – линейные размеры опухоли (см).

В течение 2 месяцев отмечали гибель крыс, определяя продолжительность жизни павших и излеченных животных. Животных считали излеченными при выживании в течение 2 месяцев после введения препарата и условия, что опухоль не пальпируется.

Результаты. Установлено, что препарат проспирина в виде гидрогеля является более эффективным по сравнению с инъекционной формой цитостатика. Медико-биологические исследования показали, что после введения инъекционной формы проспирина количество излеченных животных с саркомой М-1 и саркомой Йенсена составило 50% от общего числа.

Такие же дозы проспидина в составе препарата в виде гидрогеля излечили 7 из 8 (87,5%) и 10 из 10 (100%) крыс с саркомами М-1 и Йенсена, соответственно. Противоопухолевая активность полимерсодержащего препарата на основе проспидина в виде гидрогеля имеет более длительный период действия по сравнению с инъекционной формой. Установлено, что в начальный период времени (21 – 23 суток) тенденция торможения объема опухоли для двух препаратов на основе проспидина одинакова. Однако на 23–25 сутки после введения препарата проспидина в инъекционной форме объем опухолей вновь увеличивается. Для препарата в виде гидрогеля рецидивный рост опухолей отсутствует.

Выводы. Предлагаемый препарат проспидина в виде гидрогелей обеспечивает **существенное** повышение (приблизительно в 2 раза) эффекта противоопухолевой активности по сравнению с инъекционной формой, а также пролонгирование терапевтического действия. Применение гидрогеля проспидина приводит к полному рассасыванию опухоли у всех экспериментальных животных.

Коняева О.И., Кульбачевская Н.Ю., Ермакова Н.П., Меркулова И.Б., Бухман В.М.

**ДОКЛИНИЧЕСКОЕ
ИЗУЧЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ
СОНОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ
С ТЕРАФТАЛОМ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ
КОМБИНАЦИИ СМФ НА КРЫСАХ
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**

В последние годы интенсивно изучается возможность повышения эффективности лечения онкологических больных сочетанием сонодинамической терапии (СДТ) с ХТ. Ранее продемонстрировано, что терафтал (ТФ) обладает свойствами соносенсибилизатора, а СДТ с противоопухолевой комбинацией СМФ (циклофосфан + метотрексат + 5-фторурацил) проявляет высокую специфическую активность *in vivo*.

Целью настоящего исследования явилось изучение на крысах токсичности однократного и 3-кратного комбинированного применения циклофосфамида (С), метотрексата (М) и 5-фторурацила (F) при совместном применении с соносенсибилизатором терафталом (ТФ) и локальным УЗ-воздействием.

Материалы и методы. В работе было использовано 230 здоровых неинбредных крыс-самцов, массой 250–280 г. В качестве суммарных доз были выбраны таковые СМФ, соответствующие 2/3 (доза, вызвавшая при однократном введении гибель 3 из 5 животных), 1/2 и 1/3 от доз, адекватных человеческой дозе, пересчитанной на крыс. Препараты, входящие в схему СМФ применяли животным однократно внутривенно последовательно. ТФ использовали однократно внутривенно через 40 минут после введения цитостатиков в дозах 5 и 10 мг/кг. Через 40 минут после введения препаратов хвосты крыс подвергались воздействию УЗ с помощью установки УСДТ.

Результаты исследования. Токсичность стандартной схемы СМФ (количество павших животных, клиническая картина интоксикации, изменение массы тела и аутопсия павших животных) практически не отличалась от токсичности СМФ в сочетании с ТФ в дозе 5 мг/кг. Применение ТФ в дозе 10 мг/кг вызывало незначительное увеличение токсичности схемы СМФ (по числу павших животных).

УЗ не усиливал токсичность комбинации "СМФ + ТФ" и токсичность одной СМФ. При многократном применении отмечена тенденция к усилению токсичности как самой комбинации СМФ, так и при добавлении

к ней одного из компонентов (ТФ или УЗ) или при совместном использовании "ТФ + УЗ". УЗ и ТФ незначительно усиливают и пролонгируют гематологическую токсичность, вызванную действием СМФ. УЗ не усиливает функциональные изменения со стороны печени, поджелудочной железы и почек, вызываемые применением СМФ и "СМФ + ТФ".

Заключение. Усиление токсичности СМФ терафталом и УЗ в основном носит дозозависимый характер как для СМФ, так и для ТФ.

А.И. Котельников¹, Р.А. Котельникова¹, В.С. Романова², Н.И. Коновалова¹, Г.Н. Богданов¹, И.И. Файнгольд¹, Д.В. Мищенко¹, Д.А. Полетаева¹, А.В. Баринов¹, А.Ю. Рубцов¹, Т.Е. Сашенкова¹, Е.Н. Берсенева¹

**ФУЛЛЕРЕНЫ И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ
В НАНООНКОЛОГИИ**

¹ИПХФ РАН, Черноголовка

²ИЭС им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва

Введение. Значительное место среди современных наноматериалов занимают наноуглеродные структуры, в том числе фуллерены.

Активно развиваются работы по созданию водорастворимых производных фуллеренов, которые проявляют широкий спектр биологической активности: противоопухолевой, антиоксидантной, антивирусной, нейротропным и кардиопротекторным действием. Разработана уникальная методика синтеза гибридных биологически активных структур на основе фуллеренов (ГСФ) и эндометаллофуллеренов путем селективного присоединения к фуллереновому ядру двух аддендов.

Одним из аддендов является аминокислота или пептид, обуславливающие водорастворимость производных фуллерена, а вторым – биологически активные группировки, обладающие антиоксидантным, фотосенсибилизирующим действием, которые создают возможность донировать оксид азота или ингибировать ключевые ферменты.

Развиты методики ковалентного присоединения фуллеренов к белкам и полинуклеотидам, что важно для исследования иммунологических свойств гибридных структур и их фотодинамического действия.

Цель исследования. Изучение противоопухолевой активности ГСФ на основе фуллерена C₆₀ и клинического цитостатика метотрексата, исследование возможности использования производных фуллеренов и эндометаллофуллеренов в качестве фотосенсибилизаторов и контрастирующих материалов в ЯМР-томографии, рентгензахватной и нейтронзахватной диагностике и терапии.

Материалы и методы. Эксперименты по определению противоопухолевой активности проводили на лейкемии P388, используя мышей BDF. Препараты вводили внутривенно: метотрексат-фуллерен в дозе 2,5 мг/кг, метотрексат – в дозе 1,6 мг/кг на 1–7 сутки. Критерием активности служило увеличение средней продолжительности жизни животных.

Результаты. На основе разработанной методики синтезирована гибридная структура метотрексат-фуллерен. Показано, что токсичность данной структуры снижена в 4 раза по сравнению с исходным препаратом, а средняя продолжительность жизни животных возросла в 1,5 раза.

Созданы производные фуллерена C₆₀ – эффективные хемосенсибилизаторы и ингибиторы процесса метастазирования при введении в комбинации с цитостатиками.

При этом доза цитостатиков уменьшается в 10 раз, что приводит к снижению их токсичности и предотвращает развитие резистентности.

Развиты методы синтеза водорастворимых производных фуллеренов и эндометаллофуллеренов, что позволяет проводить исследования нового класса биологически активных соединений, перспективных для применения в качестве фотодинамических соединений и контрастирующих веществ для ЯМР-томографии, а также рентгензахватной и нейтронзахватной диагностики и терапии.

Выводы. Предложены оригинальные подходы к созданию новых наноматериалов на основе фуллеренов для использования в качестве модификаторов терапевтического действия противоопухолевых препаратов, а также перспективных соединений для фотодинамики, ЯМР-томографии, рентгензахватной и нейтронзахватной диагностики и терапии.

*В.П. Краснов, М.А. Королева,
Е.А. Ильичева, Смирнова Л.И.*

ДИЗАЙН И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ САРКОЛИЗИНА И МЕЛФАЛАНА

ИОС им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Синтез и клиническое использование сарколизина и мелфалана представляют одну из ярчайших страниц истории развития ХТ опухолей. В создании этих соединений впервые реализована идея присоединения фрагмента азотистого иприта к молекуле природного метаболита фенилаланина.

Практически сразу после выявления высокой противоопухолевой активности сарколизина в опытах на животных появилось большое количество работ, посвященных синтезу и исследованию производных сарколизина. Многие из них обладали высокой противоопухолевой активностью, а спектр их противоопухолевого действия отличался от спектра исходного соединения.

Большой интерес представляли соединения, в которых сарколизин присоединен к молекуле природных метаболитов или их аналогов. Были синтезированы и изучены производные сахаров, глицеридов, стероидов, аминокислот и пептидов.

Особое внимание исследователей привлекали соединения, в которых молекула сарколизина входила в состав пептидов и пептидоподобных соединений. Некоторые из этих соединений были отобраны для проведения клинических исследований.

Препарат цифелин, представляющий собой дипептид сарколизина с валином, разрешен для клинического применения.

Пептиды мелфалана и другие его производные и в настоящее время являются перспективными объектами интенсивных исследований.

На их основе разработаны таргетные препараты, проходящие II фазу клинических испытаний: пептид мелфалана с 4-фторфенилаланином, цефалоспориновое производное мелфалана для терапии с использованием антител, трипептид Gly-Pro-Mel и другие.

Показано, что пептиды мелфалана обладают не только противоопухолевой, но и иной биологической активностью, например, радиопротекторной, а также используются в качестве необратимых ингибиторов ряда рецепторов.

Таким образом, дизайн новых производных сарколизина и мелфалана не теряет своей актуальности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Уральского отделения РАН (проекты 09-П-3-2001 и 09-И-3-2004) и Ведущих научных школ (НШ-65261.2010.3).

*Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И.,
Ермакова Н.П., Бухман В.М.*

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ СОНОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ С ТЕРАФТАЛОМ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КОМБИНАЦИИ СМФ НА КРЫСАХ

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

В последние годы интенсивно изучается возможность повышения эффективности лечения онкологических больных сочетанием сонодинамической терапии (СДТ) с ХТ. Ранее продемонстрировано, что терафтал (ТФ) обладает свойствами соносенсибилизатора, а СДТ с противоопухолевой комбинацией СМФ проявляет высокую специфическую активность *in vivo*.

Целью настоящего исследования явилось изучение на крысах токсичности однократного и 3-кратного комбинированного применения циклофосфамида (С), метотрексата (М) и 5-фторурацила (Ф) при совместном применении с соносенсибилизатором терафталом (ТФ) и локальным УЗ воздействием.

Материалы и методы. В работе было использовано 230 здоровых неинбредных крыс-самцов, массой 250–280 г. В качестве суммарных доз были выбраны дозы СМФ, соответствующие 2/3 (доза, вызвавшая при однократном введении гибель 3 из 5 животных), 1/2 и 1/3 от доз, адекватных человеческой дозе пересчитанной на крыс. Препараты, входящие в схему СМФ применяли животным однократно внутривенно последовательно. ТФ использовали однократно внутривенно через 40 минут после введения цитостатиков в дозах 5 и 10 мг/кг. Через 40 минут после введения препаратов хвосты крыс подвергались воздействию УЗ с помощью установки УСДТ.

Результаты исследования. Токсичность стандартной схемы СМФ (количество павших животных, клиническая картина интоксикации, изменение *m* тела и аутопсия павших животных) практически не отличалась от токсичности СМФ в сочетании с ТФ по 5 мг/кг. Применение ТФ по 10 мг/кг вызывало незначительное увеличение токсичности схемы СМФ (по числу павших животных). УЗ не усиливал токсичность комбинации "СМФ + ТФ" и токсичность одной СМФ. При многократном применении отмечена тенденция к усилению токсичности как самой комбинации СМФ, так и при добавлении к ней одного из компонентов (ТФ или УЗ) или при совместном использовании "ТФ + УЗ". УЗ и ТФ незначительно усиливают и пролонгируют гематологическую токсичность, вызванную действием СМФ. УЗ не усиливает функциональные изменения со стороны печени, поджелудочной железы и почек, вызываемые применением СМФ и "СМФ + ТФ".

Заключение. Усиление токсичности СМФ терафталом и УЗ, в основном, носит дозозависимый характер как для СМФ, так и для ТФ.

К.А. Лопатина, Е.П. Зуева, Л.А. Ефимова, Т.Г. Разина, С.Г. Крылова, Е.Н. Амосова, О.Ю. Рыбалкина, М.Ю. Хотимченко, Ю.С. Хотимченко

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФУКОИДАНА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХТ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

НИИ фармакологии СО РАМН, Томск

Недостатки большинства цитостатических препаратов – неизбирательность их действия и высокая токсичность, что часто является причиной изменения или отмены схемы лечения. Актуален поиск средств, повышающих эффективность химиопрепаратов.

Задачи исследования. Изучить влияние фукоидана на развитие LLC у мышей на фоне лечения циклофосфаном.

Материалы и методы. LLC перевивали мышам-самкам линии C57Bl/6 внутримышечно. ЦФ вводили в дозе 125 мг/кг однократно внутривенно на 10 сут развития опухоли. Фукоидан назначали внутривенно с 7 сут развития опухоли курсом 11 введений в дозах 50 и 100 мг/кг. На 20 сут развития LLC вычисляли процент торможения роста опухоли, частоту метастазирования, количество, площадь метастазов. Статистическую обработку проводили с помощью критерия Вилкоксона-Манн Уитни и точного теста Фишера.

Результаты. ЦФ достоверно снижал m опухоли на 30%, количество метастазов – в 2,8 раза, площадь метастазов – в 9,8 раза относительно контроля. Количество метастазов в группе «Фукоидан 50 мг/кг + ЦФ» снижалось в 2,0 раза ($P < 0,01$), в группе «Фукоидан 100 мг/кг + ЦФ» – в 1,7 раза ($P < 0,01$) относительно этого показателя у животных, получавших цитостатик изолированно. Площадь метастазов при назначении фукоидана в дозе 50 мг/кг совместно с ЦФ уменьшалась в 2,5 раза ($P < 0,01$), фукоидана в дозе 100 мг/кг – в 1,7 раза ($P < 0,05$) по сравнению с таковой в группе «ЦФ». Фукоидан в дозе 100 мг/кг достоверно снижал количество метастазов (в 1,5 раза), их площадь – в 1,8 раза, а также m опухоли относительно контроля. Фукоидан в дозе 50 мг/кг достоверно уменьшал количество метастатических колоний в легких животных (в 1,4 раза) относительно нелеченой группы.

Выводы. Фукоидан в дозах 50 и 100 мг/кг повышает эффективность циклофосфана у мышей с LLC и обладает самостоятельным антиметастатическим действием.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям РФ в рамках направления «Живые системы» ФНТЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (государственный контракт №02.512.12.2043).

Т.А. Маньчева, Д.В. Демидов, В.Н. Анисимов, Н.А. Плотникова, Т.В. Харитонова

ВЛИЯНИЕ МЕТФОРМИНА И МЕЛАТОНИНА НА ПРОЦЕССЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

ГОУ ВПО МорГУ им. Н.П.Огарева, Саранск

Задачей нашего исследования является изучение влияния совместного применения метформина и мелатонина на канцерогенез кожи, индуцируемый бенз(а)пиреном (БП) и уровень свободнорадикальных процессов у мышей.

Эксперимент выполнен на 220 самках нелинейных белых мышей SHR. Мыши рандомизированно поделены на 4 группы по 50 мышей, оставшиеся 20 мышей служили интактным контролем. Животным экспериментальных групп два раза в неделю наносили на участок кожи спинки БП в концентрации 0,05%, растворенный в ацетоне в дозе 0,2 мл на мышью. Со следующего после введения канцерогена дня 2-я группа животных получала с питьевой водой в ночные часы (19.00–07.00) мелатонин в дозе 2 мг/л. 3-я группа – в течение всего дня метформин в дозе 200 мг/л. 4-я группа – метформин в дозе 200 мг/л и в ночные часы мелатонин в дозе 2 мг/л. 1-я группа – контрольная по канцерогену (питьевая вода без добавления препаратов). Продолжительность опыта – 26 недель, по окончании все мыши умерщвлены путем декапитации. У мышей из каждой группы взяты кровь и ткань кожи для биохимических и гистологических исследований. В сыворотке крови и гомогенатах опухолевой ткани оценивали интенсивность процессов

перекисного окисления липидов по уровню МДА и активности каталазы.

По сравнению с интактными, в группе контрольных животных, подвергавшихся воздействию только БП, отмечается достоверное увеличение (в 2,1 раза) содержания МДА в сыворотке крови ($p < 0,05$) и в 2,3 раза в гомогенатах ткани опухолей кожи. При использовании мелатонина содержание МДА в сыворотке крови составило $1,53 \pm 0,14$ ммоль/л, что достоверно ниже – в 2,6 раза ($p < 0,05$) по сравнению с интактными и в 5,5 раз ($p < 0,001$) – по сравнению с группой контрольных животных (БП+вода). Применение метформина отдельно и совместно с мелатонином привело к снижению уровня МДА в сыворотке крови до $1,72 \pm 0,15$ ммоль/л и $2,4 \pm 0,44$ ммоль/л, соответственно. По сравнению с контрольной группой отмечается достоверное снижение показателей МДА в 4,9 ($p < 0,001$) и 3,5 раза ($p < 0,001$), соответственно.

Анализ полученных результатов и сравнение их с показателями контрольной группы (индуцированный канцерогенез) позволяет предположить, что совместное применение мелатонина и метформина оказывает более выраженный корригирующий эффект на реакции перекисидации в сравнении с использованием данных препаратов по отдельности.

А.В. Масленникова, С.Н. Цыбусов, Е.И. Яковлева, Л.И. Литвинова, Н.Б. Краснова

ДИНАМИКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ, НАКОПЛЕНИЯ И ВЫВЕДЕНИЯ КОЛЛОИДНОГО МАГНЕТИТА В ОРГАНИЗМЕ ПОСЛЕ ВНУТРИСОСУДИСТОГО ВВЕДЕНИЯ

ГОУ ВПО НГМА Росздрава, Н. Новгород

Одним из наиболее перспективных компонентов систем направленного транспорта лекарств является магнетит (Fe_3O_4), однако данные относительно его динамики в организме, а также его влияния на органы и ткани при внутрисосудистом введении являются неполными и противоречивыми.

Целью настоящего исследования было изучение взаимодействия микрочастиц магнетита с органами и тканями после его внутрисосудистого введения, а также количественный анализ его распределения, накопления и выведения из организма.

Материалы и методы. Эксперименты проводились на белых беспородных крысах-самках весом 160–180 г. В хвостовую вену вводили коллоидный магнетит в дозе 25; 50; 100 и 125 мг на 1 кг веса. Животных выводили из эксперимента через 15; 30; 60 мин.; 3; 24 ч; 3; 5; 7; 15 и 20 сут после введения препарата. Проводилось гистологическое и электронно-микроскопическое исследование печени, селезенки, миокарда, почек, легких и головного мозга, а также определение концентрации железа в соответствующих тканях в различные сроки после введения магнетита.

Результаты. Во всех органах наблюдалась определенная последовательность перемещения частиц магнетита. Через 15–30 мин. после введения они локализовались в сосудах, межклеточном пространстве и мембранах отдельных клеток. В течение последующих 3 ч происходило последовательное проникновение феррочастиц через клеточную мембрану в цитоплазму и затем через кариеолемму в ядро. Через 24 ч частицы магнетита определялись практически во всех структурах клетки, оставаясь в них в течение последующих 3 сут. Начиная с 3–4 сут., частицы магнетита начинали выводиться из организма различными путями, практически полностью элиминируясь в течение последующих трех недель. ГЭБ не являлся препятствием для магнетита, который обнаруживался в ткани ГМ примерно через 24 ч, локализуясь в основном в строме.

При количественном анализе железа в органах и тканях было установлено, что максимальное накопление частиц магнетита наблюдается в печени и селезенке, где концентрация железа за первые сутки возрастала более чем на порядок и сохранялась на этом уровне в течение следующих трех суток. Начиная с 3 и вплоть до 7 сут происходило быстрое уменьшение количества железа, после чего процесс выведения магнетита значительно замедлялся.

Выводы. Основная масса частиц магнетита после внутрисосудистого введения захватывается органами РЭС. Микрочастицы магнетита способны проникать через ГЭБ.

И.Б. Меркулова, Т.В. Абрамова, Н.Ю. Кульбачевская, О.И. Коняева, В.М. Бухман, Ю.Е. Чикунова

ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ КРЫС ПРИ 1–КРАТНОМ КОМБИНИРОВАННОМ ПРИМЕНЕНИИ СМФ+ТФ И ЛОКАЛЬНЫМ УЛЬТРАЗВУКОВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ
РОИЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва

Цель исследования. Доклиническая оценка гистологических особенностей внутренних органов крыс при однократном применении комбинации СМФ в сочетании с соносенсибилизатором терафталом и локальным ультразвуковым воздействием.

Материалы и методы. Неинбредным крысам–самцам, однократно в/в вводили препараты комбинации СМФ в дозах, составляющих 1/2 и 1/3 от дозы для человека (ч/д) в пересчете на крыс.

ТФ вводили однократно в/в по 5 мг/кг через 40 мин после введения СМФ.

Локальное (хвост) УЗ–воздействие УСДТ–установки в терапевтическом режиме применяли через 40 мин после введения СМФ/СМФ+ТФ. Контрольным крысам внутривенно однократно вводили физиологический раствор натрия хлорида. На 3 и 30 сут после воздействий крыс умерщвляли усыплением диэтиловым эфиром.

Кусочки органов подвергали общепринятой гистологической обработке; препараты изучали в окрашке гематоксилином и эозином.

Результаты. На 3 сутки после применения СМФ в 1/2 или 1/3 ч/д отдельно, или с УЗ и ТФ (СМФ; СМФ+УЗ; СМФ+ТФ+УЗ) у крыс наблюдались дистрофические и деструктивные изменения различной степени в почках, печени, в сердце, надпочечниках, атрофические изменения в селезенке, лимфатических узлах, тимусе, семенниках, неострые воспалительные изменения в легких, тонкой кишке, причем эти изменения не имели четкой дозовой зависимости.

При применении 1/2 или 1/3 СМФ+УЗ морфологические изменения не отличались от таковых при применении только СМФ в обеих дозах как по качеству изменений, так и по количеству крыс с изменениями.

При применении 1/2 или 1/3 СМФ+ТФ+УЗ отмечено усиление атрофических изменений в селезенке, воспалительных изменений в легких, ослабление морфологических изменений в сердце и печени.

На 30 сутки после применения СМФ в 1/2 и 1/3 ч/д отдельно или с УЗ, или с ТФ и УЗ полного восстановления ранних изменений не наблюдалось в почках, тимусе, семенниках и легких у отдельных крыс; в селезенке и надпочечниках отмечены признаки репаративной гиперплазии.

Влияние ТФ и УЗ на морфологические особенности внутренних органов крыс при применении с комбинацией химиопрепаратов СМФ в 1/2 и 1/3 ч/д в этот срок не выражено.

Выводы. Локальное УЗ–воздействие не влияет на гистологические изменения во внутренних органах крыс, вызываемые комбинацией СМФ в 1/2 и 1/3 ч/д дозах. Применение ТФ с СМФ в 1/2 и 1/3 ч/д и с УЗ не влияет на гистологические изменения в большинстве внутренних органов крыс, но может усиливать атрофические изменения в селезенке и воспалительные изменения в легких, ослаблять дистрофические изменения в сердце и надпочечниках.

А.Н. Никитина, Е.Н. Бычкова, А.Е. Щекотихин, М.Н. Преображенская

ПОИСК ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ В РЯДУ N-ЗАМЕЩЕННЫХ 4,11-ДИМЕТОКСИНАФТО[2,3-*f*]ИЗАТИН-5,10-ДИОНОВ
НИИ НА им Г.Ф. Гаузе РАМН, Москва

Введение. Ранее была разработана схема синтеза 4,11-диметоксинафто[2,3-*f*]изатин-5,10-диона (ЛХТА-1655) и показана его способность модулировать активность митотических протеинкиназ. Для дальнейших исследований соединений этого класса нами был разработан метод синтеза *N*-замещенных нафтоизатиндионов и получены первичные данные об их антипролиферативной активности.

Цель исследования. Поиск потенциальных химиотерапевтических агентов и выявление взаимосвязей «структура активность» в ряду производных 4,11-диметоксинафто[2,3-*f*]изатин-5,10-диона.

Материалы и методы. Цитотоксичность соединений для клеток HeLa определяли МТТ–тестом.

Результаты. Для получения *N*-замещенных нафтоизатиндионов разработан метод, основанный на алкилировании 4,11-диметоксинафто[2,3-*f*]индол-5,10-диона и последующей модификации индольного ядра *N*-алкилнафтоиндолдионов в изатиновое.

Изучение антипролиферативной активности препарата ЛХТА-1655 показало, что это соединение слабо ингибирует рост опухолевых клеток (например, для линии HeLa IC50=95 мкМ).

Введение в положение 1 нафтоизатиндионов аминобутильных и бензильных групп ведет к значительному повышению антипролиферативной активности производных.

Для *N*-бензильных производных показано, что введение в *para*- или *meta*-положения бензильного заместителя атома хлора или метильной группы приводит к более чем 30–кратному повышению активности в сравнении с *N*-незамещенным препаратом ЛХТА-1655.

Введение второго атома хлора в бензильный заместитель приводит к небольшому снижению активности новых препаратов по сравнению с монохлорпроизводными.

Скрининг *N*-замещенных нафтоизатиндионов на панели эукариотических митотических протеинкиназ, выполненный в компании ProQinase GmbH, показал, что *N*-замещенные нафтоизатиндионы обладают существенно меньшей активностью, чем исходный препарат ЛХТА-1655.

Снижение активности *N*-замещенных нафтоизатиндионов в отношении протеинкиназ показывает важную роль *N*-H группы нафто[2,3-*f*]изатин-5,10-дионов при связывании с протеинкиназами.

Выводы. Обнаружена высокая биологическая активность *N*-замещенных нафтоизатиндионов и выявлена важная роль их некоторых функциональных групп в биологических свойствах соединений.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ-TNSC №07-03-92000-ННС-а.

В.Н. Оситов, К.А. Охманович,
О.С. Жукова, Л.И. Смирнова

**СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ
ЦИТОСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ
ПРЕПАРАТОВ ХИНАЗОЛИНОВОГО РЯДА**
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Достаточно большое число хиназолиновых производных являются противораковыми препаратами. В частности, в клинической практике широко применяются ингибиторы тирозин киназы эрлотиниб (Тарцева), гефитиниб и лапатиниб. В этом направлении производные 3-гидрокси-хиназолин-4-она являются интересными объектами для химической модификации и изучения биологических свойств.

Цель исследования. Синтез новых производных хиназолина и изучение цитотоксической активности полученных соединений.

Результаты. Нами синтезирован ряд производных 3-гидрокси-4(3Н)хиназолинона с применением новых, разработанных нами, методов синтеза. Эти методы включают в себя создание хиназолинового цикла и введение в него различных заместителей. Строение всех синтезированных соединений подтверждено набором физико-химических методов.

Для оценки цитотоксичности были отобраны 9 соединений по физико-химическим критериям фармафорности (правило Липински). Результаты исследований цитотоксической активности на опухолевых клетках толстой кишки человека линии LS174Т показывают, что все испытанные производные 3-гидрокси-4(3Н)хиназолинонов проявляют высокую цитотоксическую активность (при концентрации соединений 10 мкМ выживаемость клеток 6–9%).

Скрининг, проведенный в различных научных центрах в США, показал противораковую активность одного из этих соединений на 7 различных мишенях.

Все соединения рекомендованы для исследований противопухоловой активности в системе *in vivo*.

Выводы. Синтезированы новые производные 3-гидрокси-4(3Н)хиназолинона с потенциально высокой противопухоловой активностью. Показано, что полученные соединения являются перспективными для дальнейшего изучения.

Покровский В.С., Лесная Н.А.,
Романенко В.И., Трещалина Е.М.

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ
ЭФФЕКТИВНОСТИ И ПЕРЕНОСИМОСТИ
ТРЕХКОМПОНЕНТНЫХ КОМБИНАЦИЙ
С АРАНОЗОЙ**
НА МОДЕЛИ В/М ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ LLC
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Введение. Комбинация EP – стандарт лечения МРЛ. Ранее было показано, что араноза (Ar) может существенно повышать эффективность многих цитостатиков, в том числе этопозиды (E) и цисплатина (P), а также ингибиторы топоизомеразы I иринотекана (I) и топотекана (T). Трехкомпонентные комбинации с включением Ar (EPAr, IPAr и TPAr) при определенных режимах применения позволяют добиться излечения 100% мышей с п/к трансплантированной LLC при начале лечения через 48 ч после трансплантации. Поскольку лечение пациентов проводят при развившейся опухоли, на доклиническом этапе важно оценить эффективность комбинаций в аналогичных условиях. Этому посвящено настоящее исследование.

Цель исследования: оценить эффективность и переносимость комбинаций EPAr, IPAr, TPAr на модели

развившейся в/м трансплантированной чувствительной опухоли LLC.

Материалы и методы. Использованы мыши-самцы BDF₁ и штамм LLC из Банка РОНЦ (9-й пассаж). В опытные и контрольную (без лечения) группы включали по 8–10 мышей. Лечение развившихся опухолей начинали на 7 сутки при достижении V_{ср} 1410 [1107÷1713] мм³. Препараты вводили в/бр последовательно с интервалом 10–15 мин ежедневно однократно (I в дозе 30 мг/кг) или 3-кратно на 7–9 сутки после трансплантации опухоли в разовых дозах (E – 10 мг/кг; T – 0,75 мг/кг; P – 2,5 мг/кг; Ar – 100 мг/кг). Эффективность оценивали по стандартным критериям: ТРО, % и УПЖ, % в сравнении с контролем без лечения. О переносимости химиотерапии судили по ожидаемым побочным эффектам: изменению массы тела и селезенки, а также возможной гибели мышей от токсичности. Статистическую обработку данных проводили по модифицированному методу Р.Б. Стрелкова, рассчитывая доверительный интервал средних сравниваемых величин.

Результаты исследования. Комбинации EPAr, IPAr и TPAr на развившейся в/м LLC проявили длительное достоверное противоопухоловое действие, ТРО=65–76% (p<0,05) на 5–20 сутки после лечения, но без значимого продления жизни, УПЖ ≤18%. Достоверных различий между комбинациями нет. Переносимость лечения удовлетворительная, среди побочных эффектов всех комбинаций на 5–10 сутки отмечена незначительная потеря массы тела на ≤20%, для EPAr – достоверное уменьшение средней массы селезенки на ≤40% (p<0,05).

Заключение. 3-компонентные комбинации с этопозидом, цисплатином, иринотеканом, топотеканом и аранозой при лечении развившейся внутримышечно LLC равноэффективны и не вызывают побочных эффектов, кроме значительного уменьшения массы селезенки при сочетании этопозиды, цисплатина и аранозы.

И.Р. Просалкова¹, Л.З. Болиева², А.Б. Капитанов¹,
И.М. Лученко¹, В.В. Решетникова¹, С.А. Хрусталев¹,
М.Я. Шапкина¹, А.В. Сергеев¹

**ЗНАЧЕНИЕ ПОЛИЕНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ
В ПРОФИЛАКТИКЕ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ**

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва.

²ГОУ ВПО Северо-Осетинская ГМА, Владикавказ.

Введение. Полиеновые соединения (ПС) достаточно широко распространены в природе и к ним относятся ретиноиды, каротиноиды, токоферолы, ненасыщенные жирные кислоты (НЖК) и другие БАВ. ПС обладают двумя общими свойствами, имеющими важнейшее значение для биологии и медицины: они входят в состав всех клеточных и субклеточных мембран и являются мощными природными антиоксидантами, т.е. ингибируют образование свободных радикалов и активных форм кислорода. Многочисленные эпидемиологические исследования убедительно показали наличие обратной зависимости между количеством потребляемых человеком ПС и риском развития рака различных локализаций, а в экспериментальных работах доказана антиканцерогенная активность полиеновых структур. Цель исследования – итоговый анализ ранее разработанных нами препаратов и создание нового лекарственного средства на основе природного каротин-токоферолового комплекса (КТК) и НЖК плодов шиповника, томатов и других растительных объектов.

В рамках государственной программы по ликвидации медицинских последствий аварии на Чернобыльской АЭС создан первый отечественный препарат β-каротин (БК).

Препарат разработан в двух лекарственных формах, проведены все необходимые фармацевтические и доклинические медико-биологические исследования: изучена острая и хроническая токсичность, доказана антиканцерогенная, антимулагенная, иммуномодулирующая активность, изучена фармакокинетика на различных видах животных, разработаны и утверждены две ВФС, осуществлен опытно-промышленный и промышленный выпуск препарата. В дальнейшем на основе БК были разработаны комплексные препараты: «Бетаску», «Каскатол», «Каскорутол» (БК, аскорбиновая кислота, токоферол ацетат, рутин) и др. Все препараты были изучены в эксперименте и доказано наличие у них антимулагенных, антиканцерогенных, иммуномодулирующих, антиоксидантных и других свойств. Были проведены наблюдения по оценке возможности использования «Каскатола» и «Каскорутола» в группах онкологического риска (больные с мастопатией, «злостные курильщики» и др.). В настоящее время «Каскатол» и «Каскорутол» имеются в аптечной сети. В задачи настоящего исследования входит разработка рецептуры нового препарата на основе природного КТК из вышеперечисленных растительных объектов, усовершенствование технологии получения активных субстанций, разработка готовой лекарственной формы и проведение всего комплекса фармацевтических исследований, включая подготовку необходимой нормативно-технической документации, опытно-промышленный и промышленный выпуск лекарственного средства. К настоящему времени закончена работа по получению масляных экстрактов плодов шиповника (МЭШ), томатов и репейного масла. Доказано наличие у МЭШ антиканцерогенных свойств на различных моделях химического канцерогенеза у мышей, крыс, в том числе на модели эндогенного канцерогенеза, индуцированного длительным введением параоксифенилмолочной кислоты. МЭШ обладает антимулагенным, иммуномодулирующим и антиоксидантным действием.

Выводы. Новый препарат на основе МЭШ, липофильная форма из томатов и репейного масла можно рассматривать в качестве потенциального средства химиопрофилактики рака.

Розов Ф.Н., Гриненко Т.С., Левит Г.Л., Краснов В.П., Белявский А.В.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АЛКИЛИРУЮЩЕГО ПРЕПАРАТА ЛИЗОМУСТИНА ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК IN VITRO AND IN VIVO

ИОС им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург

Эффективный перенос генов в СКК необходим для успешной генной терапии заболеваний гемопоэтической и иммунной системы. Одной из наиболее перспективных стратегий для увеличения доли СКК, несущих встроенные терапевтические последовательности, является использование системы селекции *in vivo* с помощью мутантной формы фермента Об-метилгуанин-ДНК метилтрансферазы (МГМТм) в сочетании с обработкой алкилирующими ДНК агентами. В данной работе мы показали, что клетки, экспрессирующие МГМТм, могут быть селективированы с помощью лизомустина, отечественного антиракового алкилирующего препарата из класса нитрозоалкилмочевин. Экспрессия МГМТм в клетках лейкемической линии K562 и первичных клетках костного мозга мыши защищает их от цитотоксического

действия лизомустина. Мы также показали на мышиной модели, что можно достичь специфической экспансии гемопоэтических клеток, экспрессирующих МГМТм, *in vivo* после трансплантации сублетально облученным реципиентам и селекции с помощью лизомустина.

Полученные данные свидетельствуют о том, что лизомустин может быть использован как эффективный селектирующий агент, потенциально применимый для генной терапии заболеваний гемопоэтической и иммунной системы.

С.Г. Романова¹, Е.А. Лысенко²,
А.А. Штиль³, Г.А. Серебренникова⁴

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БЕСФОСФОРНЫХ АНАЛОГОВ ЭДЕЛЬФОЗИНА

¹UNMC, Omaha, USA

²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

³РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

⁴МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва

Введение. Ранее синтезированные бесфосфорные аналоги эдельфозина – катионные глицеролипиды алкильного типа – уже зарекомендовали себя в качестве агентов, способных индуцировать апоптоз лейкемических клеток линии K562.

Между тем внутриклеточные мишени их действия пока остаются малоизвестными.

Обладая высокой биологической активностью, граничащей с проявлением противоопухолевых свойств, данный класс соединений по-прежнему вызывает немалый интерес.

Цель исследования. Представленная работа направлена на изучение физико-химических свойств липидных систем, отвечая на вопросы о термодинамическом поведении и структурообразовании молекул глицеролипидов с простой эфирной связью в растворах.

Материалы и методы. Исследования выполнялись с помощью Zeta Plus Analyzer (Brookhaven Instrument Co, $\lambda = 635\text{nm}$).

К тестированию были представлены катионные глицеролипиды, содержащие алкильные заместители различной длины в положениях С1 и С2 глицеринового скелета*, присоединенного посредством сложноэфирной связи через 4 метиленовых звена к молекуле глицерина.

Приготовление опытных образцов осуществлялось методом порционного впрыскивания растворов липидов (микромольных концентраций) в подходящий растворитель в воду при активном перемешивании и нагреве до 35–40 °С.

Результаты. Было показано четкое самообразование устойчивых мицелл в водных растворах размерами не превышающими 120 нм.

Характер монодисперсности достигался озвучиванием образцов в течение 5–10 мин, при этом размеры мицелл сокращались до 80–90 нм, а величина разброса не превышала 11,5 %.

В работе дана оценка критической концентрации мицеллообразования (ККМ) липидов в водной среде. Показано единообразие в поведении ряда изученных соединений, ККМ (по методу с пиреном, $\lambda_{\text{ex}} = 333\text{nm}$) оказалась в диапазоне $1.6\text{--}2.3 \times 10^{-5}\text{ M}$.

Выводы: В ходе работы выявлено самообразование мицеллярных единиц катионных глицеролипидов в водном растворе, приведены характеристики размера частиц и ККМ.

*1,2-О-диаллил-; 1,2-О-диоктил-; 1,2-О-диоктадецил- и 1-О-октадецил-2-О-аллил-производные с катионной «головкой» в виде N,N-диметилэтанолamina

*В.Д. Румянцева¹, К.С. Шамхалов²,
В.М. Маркушев², И.П. Шилов², А.В. Иванов³,
Н.И. Полянская³, А.С. Рябов², А.Ф. Миронов¹*

**ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА ЖИВОТНЫХ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СУБСТАНЦИЙ
НА ОСНОВЕ УЬ-КОМПЛЕКСОВ ПОРФИРИНОВ**

¹МГАТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва

²ИРЭ РАН, Фрязино

³РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Цель. разработка методики флуоресцентной диагностики (ФД) злокачественных опухолей с использованием субстанций на основе иттербиевых металлокомплексов порфиринов (ИМКП), в частности*:

В отличие от известных терапевтических фотосенсибилизаторов разработанные субстанции в диагностических концентрациях не создают токсичных концентраций синглетного кислорода при проведении процедуры ФД злокачественных новообразований.

Материалы и методы. Ряд водорастворимых и гидрофобных ИМКП, всего 21 соединение. Проводилось измерение их спектров поглощения на спектрофлуориметре LS-5B Perkin Elmer, спектров флуоресценции на разработанном в ИРЭ РАН макетном волоконно-лазерном онкофлуориметре и кинетических характеристик затухания люминесценции на экспериментальной установке, разработанной в ИРЭ РАН. Эксперименты по изучению биораспределения, фармакокинетики и флуоресцентного диагностического контрастного индекса (ФДКИ) проводились на мышьяк-самках линии Bulb/c с прививкой LLC при дозах препарата на уровне 0,01-10 мг/кг веса.

Результаты. Исследованы спектральные и кинетические характеристики ряда ИМКП; установлено, что синтезированные соединения обладают высокими фотофизическими характеристиками. Проведено изучение их биораспределения и фармакокинетики.

Показано, что величина ФДКИ опухоль/мышца достигает 10,0 при использовании водорастворимой дикалиевой соли УЬ(асас)-комплекса 2,4-диметоксигематопорфирина IX.

Выводы. Разработаны методика и экспериментальное оборудование для ФД злокачественных новообразований с использованием субстанций на основе ИМКП. Полученные данные позволяют рассматривать водорастворимую дикалиевую соль УЬ(асас)-комплекса 2,4-диметоксигематопорфирина IX как перспективный маркер для ФД опухолей без свойственной традиционным порфиринам фототоксичности.

*А.В. Сергеев¹, М.Я. Шашкина¹, Л.З. Болиева²,
Е.Н. Павленко¹, В.В. Решетникова¹, С.А. Хрусталева¹,
А.Е. Хубулова², О.И. Тарасова¹*

**СОЗДАНИЕ И ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ
НОВОГО ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО
ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ФИТОЭКСТРАКТОВ**

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

²СО ГМА, Владикавказ

Введение. Экстракты корня солодки (ЭС), плодов шиповника (ЭШ), надземной части травы тысячелистника (ЭТ) обладают антиканцерогенным, антимуtagenным, иммуномодулирующим, антиоксидантным действием. В клинике доказано наличие у ЭС и ЭТ противовирусной и антимикробной активности, в том числе против вируса гепатита В и С, герпеса и ВИЧ-инфекции.

*Гидрофобного УЬ-комплекса 5, 10, 15, 20-тетра(1-N-(п-фторфенил)-3(о-хлорфенил) пиразол-4-ил) порфирина и водорастворимой дикалиевой соли УЬ(асас)-комплекса 2,4-диметоксигематопорфирина IX.

Целью настоящего исследования является создание нового лечебно-профилактического средства на основе водных лиофилизированных экстрактов вышеперечисленных растений и доклиническое медико-биологическое изучение отдельных компонентов и готовой лекарственной формы (ЛФ) препарата.

Результаты. С учетом предварительных исследований по фармакологии и иммунофармакологии (ИФ) отдельных фитоэкстрактов была разработана рецептура и ЛФ препарата в виде твердых желатиновых капсул. Отработаны методы стандартизации и контроля качества препарата, в том числе разработаны аналитические методы определения биологически активных веществ в субстанции и в ЛФ.

Анализ проводили по содержанию в препарате глицирризиновой кислоты и сумме полифенольных соединений. Образцы ЛФ были изучены в процессе длительного хранения при различных температурных режимах. Разработана необходимая нормативно-техническая документация и осуществлен опытно-промышленный выпуск препарата.

После соответствующей экспертизы получено разрешение на промышленный выпуск, применение и распространение препарата «Розолакрит» (РЛ) через аптечную сеть. В доклинических исследованиях всесторонне изучена иммуномодулирующая активность отдельных ФЭ и комплексного препарата.

При длительном введении мышам BALB/c ФЭ и РЛ вместе с кормом в течение 4–6 недель наблюдалось усиление в 2–4 раза пролиферативной активности спленоцитов, образование Т-киллеров в смешанной культуре лимфоцитов, повышение активности натуральных киллеров и цитотоксической активности перитонеальных макрофагов.

Препараты частично снимали иммунодепрессию, индуцированную цитостатиком аранозой. Антиканцерогенное, антимуtagenное и антиоксидантное действие ЭС изучено на модели канцерогенеза, индуцированного у крыс N-нитрозодиэтиламино (ДЕНА).

Антиканцерогенная активность ЭС проявлялась в достоверном снижении частоты возникновения и степени малигнизации неопластических изменений в печени, снижении множественности и злокачественности новообразований пищевода, в увеличении латентного периода появления опухолей и удлинении срока жизни животных.

ЭС уменьшал частоту хромосомных aberrаций в клетках костного мозга и тормозил процесс перекисного окисления липидов, индуцированных ДЕНА. Длительное введение крысам ЭС уменьшало гематотоксичность и общую токсичность у крыс, вызванную хроническим введением ацетата свинца.

Выводы. Проведенные исследования позволяют рассматривать РЛ в качестве потенциального средства для химиопрофилактики рака.

*М.А. Сироткина^{1, 2}, В.В. Елагин¹, М.В. Ширманова¹,
А.В. Желгов³, В.А. Каменский³, Е.В. Загайнова¹*

**ПРИМЕНЕНИЕ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ
ЛОКАЛЬНОГО НАГРЕВА
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ**

¹НГМА

²ИХФ РАН им. Н.Н. Семенова, Москва

³ИПФ РАН, Н. Новгород

Цель. Разработка методики лазерной гипертермии опухолей на основе золотых наночастиц с прижизненным контролем накопления методом ОКТ.

Материалы и методы. Исследование выполнено на модели опухоли рак шейки матки мышей. Золотые наночастицы с максимумом экстинкции 800–950 нм вводили в/в в дозе 10^8 частиц на животное. Накопление наночастиц в опухоли контролировали методом оптической когерентной томографии (ОКТ). Изображения получали каждые 30 мин до достижения максимально высокого уровня ОКТ сигнала. Затем на опухоль воздействовали лазером с λ 810 нм. Гипертермию проводили при 44–45 °С в течение 20 мин. Нагрев контролировали ИК-термографом. Эффективность лечения оценивали по ТРО. Верификацию наночастиц в опухоли выполняли методом электронной микроскопии.

Результаты. Через 2–2,5 ч после инъекции наночастиц наблюдали постепенное возрастание сигнала на ОКТ–изображениях опухоли. Максимальный уровень сигнала отмечен через 4–5 ч после введения наночастиц, что соответствовало времени максимального накопления наночастиц в опухоли. В этот период проведена лазерная гипертермия опухолей. Анализ термограмм показал, что нагрев опухоли, содержащей наночастицы, происходит локально, без распространения на окружающие здоровые ткани. Отмечено, что скорость нагрева опухоли с наночастицами в 3–3,5 раза выше, а мощность лазера – на 0,2–0,3 Вт меньше, чем в случае гипертермии опухоли без наночастиц. ТРО составило 66% на 5 сутки после воздействия. Методом электронной микроскопии золотые наночастицы обнаружены как в цитоплазме опухолевых клеток, так и внутри ядра и рядом с митохондриями.

Выводы. Применение золотых наночастиц для гипертермии опухолей позволяет осуществлять более локальное лазерное воздействие при меньшей мощности излучения. Гипертермия с наночастицами приводит к значительному замедлению роста экспериментальной опухоли.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (09-02-97072, 09-02-12215, 09-02-00539, 09-02-90736), грант президента МД-3018.2009.7.

П.И. Скопин

ВЛИЯНИЕ ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ АЭРОИОНОВ КИСЛОРОДА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ХТ

ГОУ ВПО МорГУ им. Н.П. Огарёва, Саранск

Актуальность. Известный русский ученый А.Л. Чижевский считал, что развитие опухолевых образований может быть обусловлено систематическим аэрионным дефицитом, который постоянно испытывает человек. Это ведет к нарушению эндогенного электрообмена, снижает электрический потенциал клеток, тканей и органов, нарушает их метаболизм и вызывает преждевременное старение, на фоне которого и развиваются злокачественные образования. Следовательно, целесообразно изучение возможности включения аэрионотерапии в комплекс противоопухолевых методов лечения.

Цель. Изучение воздействия комбинации рубомицин+ОАИК на метаболические показатели и характеристики опухоли в условиях роста холангиоцеллюлярного рака РС-1.

Материал и методы исследования. Эксперимент выполнен на 42 нелинейных белых крысах обоего пола массой 80–90 г, содержащихся в стандартных условиях в виварии ГОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарёва». Использована модель неоплазии, создаваемая путем перевивки опухолевого штамма холангиоцел-

люлярного рака крыс РС-1 (опухолевый банк РОНЦ). На 21 сутки роста опухоли животные были разделены на 3 серии. Контрольную составили 14 животных с опухолью. В 1 экспериментальной группе ($n=14$) производилось моделирование противоопухолевой ХТ рубомицином в дозе 4 мг/кг, внутривнутрино на 20; 22; 24 и 26 сутки роста опухоли. Во 2 группе ($n=14$) оценивалось влияние комбинированного применения рубомицина и отрицательных аэрионов кислорода, образующихся под влиянием электроэфлювиальной люстры Чижевского (100 000 аэрионов в 1 см^3 в 1 мин.). Люстра помещалась на расстоянии 1,5 м от клетки, проводилось ежедневное шестичасовое облучение. Животных забивали путем декапитации после в/брюшного введения раствора тиопентала натрия в дозе 50 мг/кг на 38 сутки после перевивки опухоли. В плазме, эритроцитах, гомогенатах печени, почек, сердца, а также в опухолевой ткани определяли содержание МДА и индуцированного железом Fe-МДА, отражающего резерв ПОЛ (Конюхова С.Г., 1989), рассчитывали антиокислительную активность (АОА) (Клебанов Г.И., 1999), расчет резерва липидов для перекисного окисления (РЛПО) осуществляли по методу Д.И. Кузьменко и Б.И. Лаптева (1997), определяли активность ферментов антиокислительной защиты – каталазы (Королук М.А., 1988) и СОД по методу С. Чевари (1990). Оценивали массу опухоли, ИМО, ИТРО. Статистическая обработка результатов проведена с помощью t-критерия Стьюдента и программы «Primer of Biostatistics for Windows» v.4.03 (1998).

Результаты. В условиях роста РС-1 выявлено значительное усиление процессов ПОЛ в организме животных на фоне резкого снижения антиокислительной защиты, применение рубомицина усугубляло эти изменения. Применяемые в эксперименте ОАИК на фоне введения рубомицина повышали активность каталазы в плазме крови, почках на 144% ($p<0,001$) и 49% ($p<0,001$), соответственно, по сравнению с монотерапией рубомицином. При этом содержание МДА снизилось в эритроцитах на 8% ($p<0,05$), в плазме крови на 52% ($p<0,001$), в печени на 37% ($p<0,001$), что говорит о подавлении активности процессов ПОЛ в этих тканях. На этом фоне отмечалось повышение АОА в эритроцитах, плазме крови, тканях печени на 52% ($p<0,05$); 106% ($p<0,001$); 58% ($p<0,001$) соответственно. В эритроцитах, плазме крови и ткани печени увеличился РЛПО на 50% ($p<0,05$); 298% ($p<0,001$) и 319% ($p<0,001$) соответственно. В сердечной мышце ОАИК способствовали уменьшению кардиотоксичности рубомицина, что выражалось в снижении содержания МДА на 49% ($p<0,005$) на фоне увеличения РЛПО на 319% ($p<0,001$), усиления АОА на 110% ($p<0,001$), повышения активности каталазы на 71% ($p<0,001$). Важно, что в ткани опухоли комбинация ОАИК и рубомицина приводила к активации процессов липопероксидации: содержание МДА увеличилось на 50% ($p<0,05$), снизился РЛПО на 44% ($p<0,001$) и АОА на 18% ($p<0,05$) на фоне снижения активности каталазы на 60% ($p<0,001$). При применении ОАИК на фоне введения рубомицина количество патологических митозов в краевой зоне опухоли уменьшилось на 51% ($p<0,001$), в сравнении с таковым показателем в группе животных, получавших только химиопрепарат. Применение рубомицина в изучаемой дозе приводило к уменьшению массы опухоли, ИМО, ИТРО составил $33,54\pm 7,05\%$ ($p<0,05$). В условиях комбинации рубомицин+ОАИК было дополнительное снижение массы опухоли на 47% ($p<0,05$), ИМО на 32% ($p<0,05$), повышение ИТРО на 91% ($p<0,001$) по сравнению с группой получавших монотерапию рубомицином.

Выводы. Использование отрицательных аэроионов кислорода на фоне ХТ рубомицином способствовало снижению уровня эндогенной интоксикации, снижению накопления вторичных продуктов перекисного окисления липидов, росту антиокислительной защиты ткани печени и сердца на фоне роста холангиоцеллюлярного рака РС-1 по сравнению с монотерапией рубомицином. Кроме того, дополнительное применение отрицательных аэроионов кислорода повышало противоопухолевую активность рубомицина, что проявлялось уменьшением массы опухоли, повышением ИТРО, снижением количества патологических митозов.

3.С. Смирнова, Л.М. Борисова, М.П. Киселева,
Т.Д. Миникер, Л.В. Эктова, С.Я.Мельник

**ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ
СОЕДИНЕНИЯ ЛХС-1208
(N-ГЛИКОЗИЛИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ
ИНДОЛО[2,3-а]КАРБАЗОЛА)
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**

В последние десятилетия за рубежом N-гликозиды замещенных индоло[2,3-а]карбазолов вызывают большой интерес в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов, и некоторые из них уже проходят клинические испытания. Установлено, что N-гликозилированные производные индоло[2,3-а]карбазола могут действовать на одну или несколько мишеней, например, протеинкиназу С, топоизомеразы, киназы, ДНК. Поэтому противоопухолевая активность индолокарбазолов может быть обусловлена их способностью взаимодействовать со многими мишенями и, следовательно, индуцировать разные пути клеточной гибели. Выявленная ранее высокая противоопухолевая активность у двух производных индоло[2,3-а]карбазолов послужило основанием для продолжения исследований в этом ряду соединений.

Целью настоящего исследования явилось изучения противоопухолевой активности нового соединения ЛХС-1208, модифицированного по пиррольному кольцу и синтезированного в лаборатории химического синтеза.

Материалы и методы. Противоопухолевую активность соединения изучали на перевиваемых опухолях мышей: лимфолейкозе Р-388, LLC и меланоме В-16. В опытах использовали гибридов ВДФ₁. Критерии эффективности: ТРО, % и УПЖ, %. Соединение растворяли в 10 %-ном р-ре ДМСО и вводили в/б 5 дней в широком диапазоне доз 10÷100 мг/кг.

Результаты. ЛХС-1208 оказывает терапевтический эффект на Р-388, равный 119 % УПЖ в дозе 100 мг/кг. На LLC в дозах 75 и 100 мг/кг также выявлен высокий терапевтический эффект: ТРО = 91–72% и сохраняется в течение 8 дней. При изучении противоопухолевой активности ЛХС-1208 на меланоме В-16 выявлена четкая зависимость терапевтической эффективности от дозы и в дозе 100мг/кг наблюдается 91% ТРО непосредственно после окончания лечения и 58% ТРО через 5 дней.

Заключение. Результаты по противоопухолевой активности соединения ЛХС-1208 дают основание продолжить изучение его эффективности на других моделях опухолей мышей.

3.С. Смирнова¹, Л.М. Борисова¹, М.П. Киселева¹,
П.А. Капитанов², А.Б. Капитанов¹

**ОЦЕНКА ЛЕЧЕБНОГО И ЛЕЧЕБНО-
ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА
ТОМАТОЛА НА РПЖ R3327 MatLyLu КРЫС**

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

²Icon Holding, Дублин, Ирландия

Рак предстательной железы – одна из основных причин смертности среди мужчин старше 50 лет. За-

болеваемость РПЖ очень сильно отличается в зависимости от региона. В России в настоящее время наблюдается тенденция к выходу этого заболевания на первое место в структуре онкологической и онкоурологической заболеваемости мужской части населения. РПЖ составляет 2,9% всех онкологических и 36% онкоурологических заболеваний. К сожалению, в нашей стране у подавляющего большинства мужчин данное заболевание выявляется при наличии клинических проявлений, т.е. диагностируются распространенные формы РПЖ.

В этой связи в последнее время ученые разных стран уделяют большое внимание новой области исследований – фитохимиопрофилактике гиперплазии простаты и РПЖ с помощью химических соединений из растений, употребляемых в пищу человеком. Наиболее перспективным в этом отношении является ликопин – каротиноид, входящий в состав томатов и некоторых фруктов.

Целью исследования является оценка лечебного и лечебно-профилактического эффекта препарата Томатол, содержащего каротиноид ликопин, при гормононезависимом раке предстательной железы R3327 MatLyLu крыс Copenhagen.

Материал и методы. Работа выполнена на крысах-самцах линии Copenhagen массой 200–250 г R3327 MatLyLu перевивали подкожно в правую подмышечную впадину по 200 000 опухолевых клеток в 0,2 мл среды 199. Критерием оценки терапевтического эффекта служило ТРО, %. Томатол вводили в дозе 10 мг на кг массы тела крысы перорально с использованием зонда. При изучении лечебно-профилактического действия Томатол вводили перорально в течение 13 дней до перевивки опухоли и затем через 72 часа после перевивки R3327 MatLyLu еще в течение 20 дней. Терапевтическое действие Томатола изучали после его перорального введения в течение 20 дней через 72 часа после перевивки R3327 MatLyLu.

Результаты. Лечебно-профилактическое действие Томатола при R3327 MatLyLu вызывает стойкий терапевтический эффект, который сохраняется в течение 17 дней наблюдения и составляет 58% – 41% ТРО. При использовании лечебного режима введения Томатола наблюдается только кратковременный статистически значимый противоопухолевый эффект на 10 день после перевивки R3327 MatLyLu, который составляет 52% ТРО.

Полученные данные дают основание продолжить изучение профилактического и лечебного действия Томатола при РПЖ.

Усов А.И.¹, Евсенко М.С.², Автономова А.В.²,
Исакова Е.Б.², Бухман В.М.²⁻³, Леонтьева М.И.²,
Краснопольская Л.М.²

**ПОЛИСАХАРИДЫ ИЗ МИЦЕЛИЯ G.LUCIDUM
КСИЛОМАННА И ФУКОГАЛАКТАН:
ПОЛУЧЕНИЕ**

И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА

¹ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва

²НИИ ИА им. Г.Ф. Гаузе РАМН, Москва

³РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Введение. Трутовик лакированный, *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. – один из наиболее известных лекарственных базидиомицетов. Из плодовых тел, базидиоспор и мицелия *G.lucidum* выделены вещества, обладающие различными биологическими свойствами, прежде всего противоопухолевыми и иммуномодулирующими. Метаболиты *G.lucidum*, отвечающие за эти свойства, относятся преимущественно к полисахаридам и тритерпенам.

Цель настоящей работы. Получении опытной партии погруженной биомассы *G.lucidum* в условиях производственного биореактора, выделения индивидуальных полисахаридов и оценки их противоопухолевых свойств в опытах *in vivo*.

Материалы и методы. В работе использовали штамм *G.lucidum* коллекции лаборатории биосинтеза биологически активных соединений НИИ НА им. Г.Ф. Гаузе РАМН. Для погруженного культивирования *G.lucidum* использовали биореактор. Выделение ксилломанна и фукогалактана проводили по методике Усова А.И. и сотр. [Биохимия, 2009. – Том 74. – Вып. 5. – С. 657–67]. Противоопухолевую активность оценивали в стандартных онкологических системах – рост привитых подкожно мышам-гибридам B6D2F₁ солидных лимфомы P388, меланомы B16 и карциномы молочной железы Ca755. Препараты вводили как однократно на 3 с опыта, так и ежедневным курсом с 3 по 12 сут. Путь введения через рот или внутримышечно. Разовые дозы от 0,2 до 20 мг/кг. Проводили также антисупрессорную обработку мышей некоторых групп однократной инъекцией циклофосфида в дозе 50 мг/кг в/бр на 3 с опыта. За достоверные признали отличия при $P < 0,05$.

Результаты. Ксилломанн изучен во всех указанных моделях. Полисахарид во всех изученных режимах вызывает сильное устойчивое торможение роста опухоли без проявлений токсичности. При однократном введении его активность проявляется сильнее у мышей, получивших антисупрессорную обработку циклофосфамидом. Фукогалактан пока изучен только при курсовом внутривенном введении мышам, привитым клетками Ca755. Полисахарид проявил сильную противоопухолевую активность.

Заключение. Впервые получены 2 новых полисахарида *G.Lucidum*. Оба полисахарида, Ксилломанн и Фукогалактан, проявляют высокую избирательную противоопухолевую активность в отношении солидных мышей и заслуживают дальнейшего углубленного изучения.

И.И. Файнгольд¹, Р.А. Котельникова¹,
Н.П. Коновалова¹, В.С. Романова², Д.В. Мищенко¹,
Д.А. Полетаева¹, Г.Н. Богданов¹, А.И. Котельников¹

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ГИБРИДНЫХ СТРУКТУР НА ОСНОВЕ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХТ

¹ИИХФ РАН, Черноголовка

²ИЭОС им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва

Введение. В настоящее время повышенный интерес вызывают прикладные аспекты химии наноразмерных углеродных кластеров и гибридных структур на основе фуллерена C₆₀ (ГСФ), в которых роль мембранотропных стереоспецифических носителей группировок с заданными физиологическими свойствами выполняют фуллерены.

Цель исследования. Изучение антиоксидантной активности ГСФ и их применение в экспериментальной ХТ.

Материалы и методы. В работе исследованы ГСФ: C₆₀-Pro(OH), C₆₀-Pro(NO₂), C₆₀-Pro(NO₂)₂, C₆₀-Pro(carnosine). Антиоксидантную активность ГСФ изучали по изменению интенсивности ПОЛ биологических мембран гепатоцитов в присутствии производных фуллерена. Интенсивность ПОЛ оценивали по содержанию МДА – промежуточного продукта окисления полиненасыщенных жирных кислот. Исследование противоопухолевого эффекта при комбинированной терапии цитостатиком ЦФ с

ГСФ проводили на самцах-гибридах BDF₁ с лейкемией Р-388. Для проведения эксперимента выбраны низкие субтерапевтические дозы цитостатика. Препараты вводили внутривенно. Эффективность терапии оценивали по проценту излеченных животных и УПЖ, % животных.

Результаты. Показано, что под влиянием гибридных соединений на основе фуллерена C₆₀ в значительной степени замедляется накопление МДА. При этом наиболее эффективным действием обладает фуллеренил-карнозин C₆₀-Pro(carnosine), который подавляет ПОЛ в 4 раза интенсивнее, чем остальные производные. Этот эффект объясняется тем, что, с одной стороны, углеродный сфероид фуллерена C₆₀ является акцептором свободных радикалов, а с другой стороны – карнозин катализирует распад пероксидов и усиливает антиоксидантные свойства ГСФ. Полученный результат представляется важным в свете использования ГСФ в экспериментальной онкологии.

Монохимиотерапия гибридными соединениями на основе фуллерена C₆₀ не оказывает противоопухолевого эффекта. При комбинированной терапии все ГСФ приводили к повышению противоопухолевого эффекта ЦФ и излечению части животных. Максимальный терапевтический эффект проявлялся излечением 65% и 80% животных при совместном применении ЦФ с нитратами аминокислотных производных фуллерена C₆₀ (C₆₀-Pro(NO₂) и C₆₀-Pro(NO₂)₂, соответственно), при этом средняя продолжительность жизни животных увеличивалась примерно в 1,5–2 раза по сравнению с терапией одним циклофосфамидом. Поскольку известно, что NO является эффектором апоптоза, этот факт подтверждает влияние нитратов аминокислотных производных фуллерена C₆₀ на антилейкемическую активность ЦФ.

Выводы. Гибридные соединения на основе фуллерена C₆₀ являются биоантиоксидантами и хорошими адъювантами для «классического» противоопухолевого агента циклофосфида на модели лейкемии Р-388. Результаты работы вносят существенный вклад в решение фундаментальных проблем нанотехнологии биологически активных веществ и их применения в медицинской практике.

Е.П. Федорова, О.В. Колотова,

О. Л. Воронова, А. А. Чурин

КОРРЕКЦИЯ ГЕМАТО- И ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПАКЛИТАКСЕЛА

ЭКСТРАКТОМ ШЛЕМНИКА БАЙКАЛЬСКОГО
НИИ фармакологии СО РАМН, Томск

ХТ в современной онкологии наряду с оперативным способом и лучевым воздействием является одним из важнейших компонентов лечения. Значимой остается проблема повреждения клеток здоровых тканей вследствие низкой селективности антибластомных средств. Актуальным является поиск корректоров, снижающих токсическое действие цитостатиков на пораженные ткани.

Данное исследование посвящено изучению гемато- и генотоксичности паклитаксела, а также возможности коррекции выявленных эффектов экстрактом шлемника байкальского.

Эксперименты проведены на 80 мышам линии СВА/Са Лас и 100 нелинейных аутбредных крысах-самках. Паклитаксел мышам вводили однократно в/б в МПД 40,0 мг/кг, крысам однократно в/в в МПД 5,0 мг/кг. Экстракт шлемника байкальского вводили по 40 мг/кг *per os* курсом в течение 5 дней.

Изучение показателей кроветворных органов проводили стандартными гематологическими методами. Цитогенетические нарушения оценивали по модифицированному методу Форда. Введение паклитаксела через 6 и 24 часа у крыс приводило к снижению содержания незрелых и зрелых гранулоцитов, эритрономобластов и лимфоцитов. В периферической крови отмечено развитие ретикулоцитопении, нейтропении, лимфоцитопении. Введение экстракта шлемника байкальского способствовало увеличению общей клеточности костного мозга за счет повышения числа сегментоядерных лейкоцитов. Количество эритроидных клеток было увеличено на протяжении всего периода исследования. В периферической крови отмечено возрастание абсолютного количества лейкоцитов за счет повышения содержания нейтрофилов и лимфоцитов, а так же увеличение числа ретикулоцитов на протяжении всего периода исследования. Через 24 часа после введения паклитаксела у мышей наблюдалось увеличение числа аберрантных хромосом, доли поврежденных клеток и количества полиплоидных клеток. Введение экстракта шлемника байкальского до инъекции цитостатика, снижало количество аберраций и общее число поврежденных метафазных пластинок.

Таким образом, применение экстракта шлемника байкальского в качестве корректора на фоне действия паклитаксела приводило к нормализации процессов кроветворения и оказывало генопротекторные эффекты при его применении до введения цитостатика.

Фрадкин В. Г.

ОПЫТ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НУКЛЕОСПЕРМАТ НАТРИЯ ГУЗ МООД

Введение. В ГУЗ МООД использование препарата «Нуклеоспермат натрия» проводится с 2005 г. у больных со злокачественными новообразованиями различных локализаций, получающих самостоятельное, комбинированное или комплексное лечение. Известно, что препарат активизирует процессы пролиферации, миграции и дифференцировки нейтрофильных гранулоцитов, эритроцитов, тромбоцитов и лимфоцитов. Кроме того, лекарственное средство активирует и повышает содержание клеток-киллеров CD4⁺, стимулирует антителообразование, что обуславливает резкое усиление иммунного ответа и оказывает положительное влияние на течение раневого процесса после обширных хирургических вмешательств, обладает дезинтоксикационным эффектом.

Цели исследования. Оценка гемостимулирующего эффекта препарата и действия на иммунный статус пациентов. Оценка возможности его профилактического применения для предотвращения развития нейтропении у пациентов, получающих ХТ и/или ЛТ.

Материалы и методы. Препарат применяли у 20 пациентов отд. общей радиологии с разными онкологическими диагнозами. Пациентам проводили ЛТ в комбинации с разными режимами ХТ. Нуклеоспермат натрия применяли в дозировке 75 мг/день в течение 3–10 дней и в тах сут. дозировке 150 мг у некоторых пациентов. Введение препарата проводили одновременно с продолжением химиолучевой терапии.

Результаты. Гемостимулирующий эффект отмечен у 18 пациентов (90%). Средний срок восстановления числа лейкоцитов составил от 4 до 9 дней. У большинства применение препарата купировало лейкоцитопению, что дало возможность продолжить лечение по плану. Наиболее оптимальные результаты мы получили при введении препарата по 75 мг в течение 5 дней. Отмечена положительная динамика течения раневого

процесса у пациентов с обширными хирургическими вмешательствами, получающих комбинированное лечение. Введение препарата больные переносили удовлетворительно. Побочные эффекты были незначительны, проходили самостоятельно.

Выводы. Нуклеоспермат натрия показал высокую эффективность в профилактике нейтропении при комбинированном/комплексном лечении. Преимущество средства – возможность его применения одновременно с химиолучевой терапией. Наши данные позволяют рекомендовать Нуклеоспермат натрия для профилактики/лечения нейтропении при проведении лучевой, химиолучевой терапии, а также для профилактики общих и местных реакций в период и после окончания комбинированного и комплексного лечения.

Е.В. Хорошева¹, Г.К. Герасимова¹,
Е.М. Трещалина¹, А.Л. Николаев²

ПРЕОДОЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ УЗ-ВОЗДЕЙСТВИЯ В КОМБИНАЦИИ С ТЕРАФТАЛОМ *IN VITRO*

¹РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва
²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

В настоящее время интенсивно проводится исследование биологических эффектов локального нетеплового ультразвукового воздействия. Ранее показано *in vivo*, что сочетание УЗ воздействия с препаратом терафтал, не обладающим собственной цитотоксической активностью, приводит к повышению циторедуктивного действия УЗ на перевиваемые опухоли животных (Е.М. Трещалина, Н.В. Андропова). Принимая во внимание разнообразные эффекты, обуславливающие сонодинамическое действие ТФ, в том числе повреждение клеточных мембран, изучена *in vitro* возможность подавления роста опухолевых клеток с фенотипом МЛУ с помощью УЗ воздействия и его комбинации с ТФ.

Материалы и методы. Воздействие УЗ на клеточную культуру проводили на генераторе УЗ, разработанном для исследований *in vitro*. Клетки линии К562/4 с индуцированной устойчивостью к Дох инкубировали 1 час с ТФ (10⁻⁵М) при 37 °С в культуральных флаконах по 50 мл. Затем проводили УЗ-воздействие на клеточную суспензию в течение 3 мин. в 2 режимах: постоянном с несущей частотой 2,64 МГц с мощностью 1 Вт/см² и импульсном – с той же несущей частотой и импульсом 20 Гц; 225 Гц; 610 Гц; 1240 Гц. Цитотоксический эффект определяли МТТ–тестом через 72 ч. Чувствительность клеток к Дох оценивали по величине ЕС50, которую рассчитывали методом регрессионного анализа. Контролем служили клетки без УЗ-воздействия.

Результаты. Однократное УЗ-воздействие в постоянном режиме снижает устойчивость клеток К562/4 к доксорубину в 10 раз, а в импульсном режиме 225 Гц; 1240 Гц; 20 Гц в 100; 50 и 25 раз соответственно. УЗ-воздействие в постоянном режиме в сочетании с ТФ в качестве соносенсибилизатора снижает устойчивость к доксорубину в 2,5 раза эффективнее, чем один УЗ. Наблюдаемый эффект сохраняется как минимум в течение трех клеточных генераций. Однако ТФ не усиливает циторедуктивный эффект УЗ-воздействия в импульсном режиме.

Выводы. Однократное УЗ-воздействие низкой интенсивности с несущей частотой 2,64 МГц в постоянном и импульсном режиме мощностью 1 Вт/см² вызывает снижение устойчивости клеток К562/4 с фенотипом МЛУ к доксорубину. Соносенсибилизатор ТФ усиливает эффект УЗ, применяемого только в постоянном режиме.

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства г. Москвы.

Т.Ю. Хричкова, В.Е. Гольдберг, Н.О. Попова, В.А. Шаталова, Е.С. Бурштейн

ВЛИЯНИЕ ХИМИОТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ ПРЕПАРАТОВ ТАКСАНОВОГО РЯДА НА КОСТНОМОЗГОВОЙ РЕЗЕРВ НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ

НИИ онкологии, НИИ фармакологии СО РАМН, Томск

На сегодняшний день достоверно подтверждена выраженная эффективность таксаносодержащих химиотерапевтических режимов адриабластин/таксотер (АТ) и таксотер/цисплатин (ТР) при лечении распространенных форм РМЖ и РЛ соответственно. Частым осложнением указанных режимов химиотерапии является угнетение гранулоцитопоэза.

Одним из наиболее чувствительных методов изучения функционального состояния гранулоцитарного ростка является преднизолоновая проба, позволяющая определять запас в костном мозге зрелых нейтрофилов и способность их к выходу в периферическую кровь в ответ на введение кортикостероидов.

Целью настоящей работы явилась оценка резервных возможностей кроветворной ткани у больных РМЖ и РЛ, получающих лечение по схемам, включающим таксотер.

В ходе работы было обследовано 77 больных РМЖ, получающих химиотерапию по схеме АТ и 45 больных РЛ, леченых по схеме ТР. Показатели гематологической крови исследовали стандартными гематологическими методами. По данным преднизолоновых проб оценивали состояние костномозгового резерва нейтрофильных гранулоцитов.

Использование режима АТ приводило к достоверному снижению общее количество лейкоцитов (ОКЛ) только на два срока исследования (после 1 и 2 курсов ХТ). Применение схемы ТР вызывало уменьшение ОКЛ после каждого курса химиотерапии с восстановлением к началу следующего.

При введении преднизолона больным РМЖ и РЛ было выявлено преходящее повышение числа нейтрофилов в периферической крови, что свидетельствует о наличии типичной реакции на гормональный препарат. Совершенно другая картина имела место при использовании режимов АТ и ТР в лечении вышеназванных пациентов, а именно наблюдалось не только достоверное увеличение выброса нейтрофилов почти на все часы пробы, но и возрастание величины максимального выброса данных клеток на все сроки исследования.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что, наряду с выраженным противоопухолевым эффектом, изученные комбинации цитостатических препаратов характеризуются щадящим воздействием на костномозговые резервы гранулоцитарного ростка, что весьма значимо в связи с расширяющимся диапазоном применения таксаносодержащих режимов цитостатического лечения.

Шатова О.П.

СТИМУЛЯЦИЯ АДЕНОЗИН-ОПОСРЕДОВАННОГО АПОПТОЗА ФТОРУРАЦИЛОМ

ДНМУ им. М. Горького, Донецк

Аденозиндезаминаза (АДА) – ключевой фермент метаболизма пуриновых нуклеотидов гидролитически превращает аденозин в инозин и аммиак. Известно прямое влияние химиопрепаратов на активность этого фермента. Антиметаболит 5-фторурацил уменьшает активность этого фермента в 2 раза при

инкубации в течение 10 минут, а циклофосфан и метотрексат увеличивает активность этого фермента приблизительно в 2–3 раза.

Цель. Выяснить возможность связывания 5-фторурацила с аденозином согласно правилу Чаргофа, путем увеличения аденозина в инкубационной среде в 2 раза.

Материалы и методы. Определение АДА основано на изменении оптической плотности реакционной смеси при λ 265 нм, обусловленном дезаминированием аденозина до инозина.

Серия опытных проб содержала в 2 раза больше субстрата (аденозина), по сравнению с контролем. Все пробы содержали 5-фторурацил.

Результаты и выводы. В контрольной пробирке активность АДА $25,7 \pm 3$ нмоль/(мин*мг), а в опытной 62 ± 17 нмоль/(мин*мг), что приблизительно соответствует нормальному значению. При увеличении количества аденозина активность АДА увеличивается, что возможно свидетельствует о том, что фторурацил образует связи с аденозином и таким образом уменьшает активность фермента. Уменьшая активность АДА, 5-фторурацил имеет еще один механизм цитостатического действия. При ингибировании АДА накапливается аденозин, который вызывает конденсацию хроматина и фрагментацию ДНК, то есть апоптоз.

А.С. Шатурова, Е.А. Дудко, О.С. Бутова, Т.А. Богущ
ОПТИМИЗАЦИЯ ИФА ЭР МЕТОДОМ ПЦР
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Цель исследования. ЭР α и β являются молекулярными мишенями антиэстрогеновых противоопухолевых препаратов и важнейшими прогностическими маркерами течения опухолевого процесса. Тем не менее, до настоящего времени не существует подходов к количественной оценке ЭР и в клинической практике определение эстрогенового статуса опухоли проводится полуколичественно при иммуногистохимическом исследовании в опухоли экспрессии только ЭРа.

Строго количественное дифференцированное определение уровня экспрессии ЭРа и ЭР β как в опухолевом узле, так и в каждой опухолевой клетке является чрезвычайно важным.

Настоящее исследование посвящено оптимизации метода оценки уровня экспрессии ЭР β для рутинного клинического использования.

Материалы и методы. Методом иммунофлуоресценции с использованием проточной цитофлуориметрии исследована экспрессия ЭР β в клетках культуры РМЖ MCF-7 и в клетках, полученных из хирургических образцов РМЖ. Использовали антитела: первичные моноклональные к ЭР β (ab288/14C8, Abcam), вторичные поликлональные (козий IgG, конъюгированный с FITC, против мышинного IgG-F2772, Sigma), изотип – мышинный IgG2a (ab18414, Abcam).

Среднюю флуоресценцию клеток анализировали на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson) с помощью программы WinMDI, количество специфически окрашенных клеток определяли методом Колмогорова Смирнова.

Результаты

- Для увеличения срока хранения опухолевого материала оптимизированы условия фиксации: показана идентичность взаимодействия специфических антител с ЭР β при фиксации в 0,01% и 4% растворе формальдегида.

2. В культуре клеток MCF-7 определен диапазон концентраций антител, в котором наблюдается линейное увеличение числа специфически окрашенных клеток в анализируемой суспензии и интенсивности специфической флуоресценции каждой клетки.
3. В линейном диапазоне концентраций антител показано увеличение специфического окрашивания клеток культуры MCF-7 при увеличении времени инкубации с первичными и вторичными антителами от 30 мин до 1,5 ч.
4. Выход специфического окрашивания клеток MCF-7 на плато (окрашивание всех клеток, экспрессирующих ЭРβ в исследуемой суспензии) достигнут при увеличении времени инкубации со вторичными антителами до 20 часов после 1,5-часовой инкубации с первичными антителами.
5. При исследовании экспрессии ЭРβ в клетках рака молочной железы, полученных из опухолей пациентов, воспроизведены все закономерности, описанные в культуре клеток MCF-7: возможность фиксации опухолевого материала в 4 % -ном растворе формальдегида; наличие линейной зависимости специфического окрашивания клеток от концентрации антител при кратковременной (30 мин или 1,5 ч) инкубации с первичными и вторичными антителами; выход на плато количества специфически флуоресцирующих клеток при увеличении продолжительности инкубации со вторичными антителами до 20 ч.

Выводы. Оптимизированный метод иммунофлуоресцентного анализа позволяет проводить количественную оценку ЭРβ в солидных опухолях человека: количественно оценивать число клеток, экспрессирующих ЭРβ и уровень экспрессии рецепторов в каждой клетке. Предложенный метод легко воспроизводим, минимально субъективен и пригоден для рутинной клинической практики. Поддержано Грантом РФФИ № 09-04-13560.

М.Я. Шапкина¹, Г.И. Кабацкая², В.В. Решетникова¹, И.Ж. Шубина¹, С.А. Зорина¹, С.А. Хрусталева¹, А.Е. Хубулова³, А.В. Сергеев¹

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ И МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ ПРЕПАРАТОВ «ЧАГОВИТ» И «ЧАГАЛЮКС»

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва
²ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова, Москва
³ГОУ ВПО СО ГМА, Владикавказ

Препараты на основе экстрактов трутового гриба чаги (ЭЧ) широко используются в фитотерапии заболеваний ЖКТ, печени, почек, при острых и хронических отравлениях и для профилактики онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний.

Целью нашего исследования явилось создание и доклиническое изучение двух новых препаратов на основе ЭЧ – «Чаговит» (ЧВ) и «Чагалюкс» (ЧЛ).

Результаты. Нами была разработана современная технология получения ЭЧ с наиболее оптимальными физико-химическими и биологическими свойствами. В предварительных исследованиях с использованием методов иммунофармакологии (ИФ) изучена биологическая активность ЭЧ в зависимости от географических регионов сбора сырья, сезона заготовки и размеров (возраста) трутового гриба. Исследовано влияние температуры экстрагента, времени экстракции, разме-

ров частиц размолотого гриба (0,1-1 мм), а также методов высушивания экстрактов (лиофилизация, распылительная сушка, инфракрасное облучение), условий и сроков хранения сухого ЭЧ на иммуномодулирующую активность (ИА). Изучен микроэлементный состав (K, Na, Mg, Mn, Cu, Zn), содержание тяжелых металлов (Pb, Hg, Co), мышьяка в различных образцах ЭЧ. При разработке рецептуры и технологии производства готовой лекарственной формы (ЛФ) препаратов были также использованы методы ИФ. ЛФ препаратов ЧВ и ЧЛ разработана в виде твердых желатиновых капсул с минимальным использованием балластных вспомогательных веществ. Разработаны критерии стандартизации и качества ЛФ препаратов, химико-аналитические методы контроля активной субстанции в ЛФ. Проведены исследования по сохранности ЛФ в течение 2-х лет при различных температурных режимах. Разработана нормативно-техническая документация и осуществлено опытно-промышленное производство препаратов.

После получения соответствующего разрешения осуществлен промышленный выпуск ЧВ и ЧЛ. В настоящее время препараты имеются в аптечной сети. В доклинических исследованиях изучено влияние ЭЧ и ЧВ на гепатотоксичность, гематоксичность и иммунотоксичность, индуцированные длительным введением крысам канцерогена N-диэтилнитрозамина (ДЭНА) или ацетата свинца (АС). ЧВ ингибировал канцерогенез, индуцированный ДЭНА, снижал частоту появления опухолей пищевода и печени, снижал степень малигнизации и множественность опухолей, удлинял латентный период образования опухолей и увеличивал продолжительность жизни животных. Длительное введение ЧВ уменьшало частоту хромосомных повреждений, вызванных ДЭНА, и снижало показатели перекисного окисления липидов. ЧВ и ЭЧ при длительном введении животным одновременно с АС уменьшали проявление гематотоксичности, корректировали вес животных и продолжительность их жизни. Вторичный иммунодефицит, индуцированный у мышей BALB/c хроническим введением АС, частично корректировался ЭЧ, что проявлялось в увеличении пролиферативной активности спленоцитов и усилении образования Т-киллеров в смешанной культуре лимфоцитов.

Выводы. Проведенные исследования позволяют рассматривать ЧВ и ЧЛ в качестве потенциальных средств химиопрофилактики рака.

З.С. Шпрах, Л.И. Смирнова, А.П. Смирнова, Л.П. Сушинина, С.В. Устинкина, В.Н. Осипов, А.П. Будько, Н.А. Дмитричева, И.В. Ярцева
ЦИФЕТРЕЛИН – РАЗРАБОТКА ПРОЕКТА ФСП НА СУБСТАНЦИЮ
 РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Введение. Цифетрелин – один из аналогов пептидного гормона соматостатина, синтезированный в лаборатории химического синтеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Высокая противоопухолевая активность цифетрелина на ряде опухолей мышей позволили рекомендовать препарат для широких доклинических исследований и потребовало разработать методы контроля качества и стандартизации цифетрелина.

Цель исследования – выбор критериев качества и разработка методик контроля качества активной фармацевтической субстанции Цифетрелин.

Материалы и методы. Синтез Цифетрелина осуществляли классическими методами пептидной химии, при синтезе фрагментов использовали метод смешанных ангидридов. Очистку субстанции проводили хроматографически на колонках с силикагелем.

Проект ФСП на активную фармацевтическую субстанцию разрабатывали в соответствии с требованиями действующих нормативных документов по контролю качества лекарственных средств.

ОСТ 91500.05.001-00, ГФ XII, часть 1 и ГФ XI.

Результаты. Оценку качества препарата проводили по показателям, принятым для контроля качества активных фармацевтических субстанций: описание, подлинность, растворимость, температура плавления, удельное вращение, посторонние примеси (родственные соединения), сульфатная зола и тяжелые металлы, вода, определяемая по методу К. Фишера, количественное определение. Подлинность цифетрелина подтверждали хроматографическими методами – в тонких слоях сорбента (ТСХ) и ВЭЖХ и спектральными характеристиками. Все изученные серии субстанции были практически свободны от золы, тяжелых металлов и содержали не более 1,0 % воды. Для определения посторонних примесей в субстанции цифетрелина и количественного определения использовали метод ВЭЖХ. Установлено, что во всех сериях препарата количество единичных примесей не превышало 1,0 %, а суммы примесей – 5 %. Количественное определение показало содержание в субстанции не менее 95 % активного вещества.

Выводы. Полученные результаты подтвердили стандартность получаемых в лабораторных условиях серий Цифетрелина и позволили разработать проект ФСП на активную фармацевтическую субстанцию.

А.Е. Щекотихин¹, И.Д. Трещалин¹, Н.А. Лесная², В.И. Романенко², Е.М. Трещалина², М.Н. Преображенская¹

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ СТЕРЕОИЗОМЕРОВ ХИНИЗАРИНА*

¹НИИНА им Г.Ф. Гаузе РАМН, Москва
²РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Введение. Ранее нами было показано, что стереоизомеры хинизарина* обладают высокой активностью в отношении опухолевых клеток с МЛУ, резистентность которых обусловлена экспрессией трансмембранного Р-гликопротеина и делецией опухолевого гена-супрессора *p53*. Наиболее активным оказался хинизарин, причем его стереоизомеры несколько различаются по спектру антипролиферативной активности. Так, в отношении клеток с обоими типами МЛУ R-изомер (шифр ЛХТА-1115) более активен, чем S-изомер (шифр ЛХТА-1114). Эффективность изомеров на животных ранее не изучалась.

Цель исследования: скрининг R- и S-изомеров хинизарина на противоопухолевую активность на мышах с лимфолейкозом Р388.

Материалы и методы. Использованы мышисамцы DBA₂ с внутрибрюшинно (в/б) перевитым Р388. Лечение проведено в/б однократно на 2 сут или ежедневно на 2-6 сут после трансплантации лейкоза. Агенты вводили однократно в разовых дозах 90–120 мг/кг или курсом в разовых дозах 25 и 30 мг/кг (суммарно 125 и 150 мг/кг). Противоопухолевый эффект оценен по УПЖ, рассчитанному в процентах по соотношению леченой и контрольной группам (n=3–4), минимальный критерий УПЖ≥25%. Значимыми считали различия при p≤0,05.

Результаты. Показано, что ЛХТА-1114 в однократной дозе 40 мг/кг был мало активен, УПЖ_{max}=18%, а при дозе 80 мг/кг приводил к гибели мышей. При курсовом лечении в дозе 25 мг/кг ЛХТА-1114 показал активность на уровне УПЖ=33%, гибель мышей наступала при разовой дозе 30 мг/кг.

ЛХТА-1115 при однократном введении в дозах 50–80 мг/кг был активен и приводил к УПЖ=25–40%, а при курсовом лечении в разовых дозах 25–30 мг/кг давал УПЖ=33–50% без гибели от токсичности.

Признаков раздражения брюшины при применении обоих агентов не отмечали.

Заключение. Результаты скрининга *in vivo* показали, что на в/б лейкозе Р388 у мышей оба изомера хинизарина в изученных дозах и режимах применения при в/б введении оказывают значимое противоопухолевое действие. Наиболее активным и лучше переносимым был R-изомер, что определяет его перспективность для дальнейшего углубленного изучения в качестве потенциального противоопухолевого средства.

Работа выполнена при поддержке грантами РФФИ №08-04-12005-офи и РФФИ-TNSC №07-03-92000-ННС-а.

Якунина М.Н., Трещалина Е.М.

СИСТЕМНАЯ ХТ С ТАКСОТЕРОМ ПРОТИВ ВНУТРИПЛЕВРАЛЬНОЙ ХТ ЦИКЛОФОСАМИДОМ ПРИ ОПУХОЛЕВОМ ПЛЕВРИТЕ У КОШЕК РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Введение. Злокачественный ОП у кошек часто является наиболее тяжелым проявлением метастазирования РМЖ и сопровождается накоплением плеврального выпота (ПВ), что резко сокращает продолжительность жизни.

Одним из традиционных методов лечения ОП у кошек считается внутривлепральная (в/пл) ХТ циклофосфамидом (ЦФ). В гуманитарной практике у больных РМЖ для лечения метастатического ОП используется последовательно системная, а потом в/пл ХТ. В последнее время при системном лечении ОП при РМЖ изучаются таксаны [Колядина И.В. и соавт., 2009 г.].

Цель исследования. Сравнить эффективность системной ХТ с таксотером и в/пл ХТ циклофосфамидом при метастатическом ОП кошек с РМЖ.

Материалы и методы. Проведен анализ 18 историй болезни кошек с РМЖ, осложненным ОП, диагностированным рентгенологически и верифицированным цитологически. У всех животных ОП развился после оперативного удаления опухоли, некоторые из них в адьювантном периоде получили ХТ доксорубицином или таксотером.

Животные с ОП были разделены на 2 группы.

1. Экспериментальная (n=12), в адьювантном режиме проведено 3–6 курсов ХТ таксотером по 30 мг/м² (n=7) или 3 курса ХТ (интервал 21 д) таксотер 20 мг/м² + доксорубин 20 мг/м² (n=5).
2. Контрольная (n=6), адьювантно проведено 1–4 курса (интервал 1 нед) в/пл ХТ ЦФ 250 мг/м².

Эффективность лечения оценена по задержке или прекращению накопления ПВ (рентгенологически; симптоматически), а также по времени до прогрессирования (ВДП) и медиане продолжительности жизни (МПЖ).

Результаты. Группа эксперимента. У 3 из 12 кошек (25%) отмечены задержка накопления и уменьшение объема ВП. Достоверное прекращение накопления ПВ отмечено у 7 из 12 кошек (58,3%, p<0,05), в случае адьювантной ХТ доксорубицином или при отсутствии ХТ в анамнезе – 71,4% а ХТ таксотером – 40% кошек. В 2 случаях (16,7%) наступило прогрессирование ОП.

*3-аминометильные производные пирроло[2,3-b] хинизарина

Без признаков ОП 3 мес прожили 47%; 6 мес – 23,9% кошек, ВДП=1,79 мес. После лечения 3 мес пережили 56,9%; 6 мес – 41,9%, а 11 мес – 21% кошек, МПЖ=2,8 мес.

В группе контроля: у всех кошек наступило прогрессирование ОП, задержки или прекращения накопления выпота не отмечено, 1 мес прожили только 20% кошек, ВДП=МПЖ=0,6 мес.

Заключение. У кошек с РМЖ и развившемся опухолевым плевритом в отличие от в/пл терапии

циклофосфамидом 250 мг/м² системная ХТ с таксотером 20–30 мг/м² в монорежиме или в сочетании с доксорубицином 20 мг/м² достоверно более результативна по всем параметрам.

Сравнительная эффективность лечения ОП с таксотером заключается в достоверной задержке или прекращении накопления плеврального выпота в 58,3% случаев, достоверном увеличении времени до прогрессирования в 3 раза ($p < 0,00017$) и медианы продолжительности жизни в 4,6 раза ($p < 0,0004$).

Издание 2-е, переработанное и дополненное

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ



Готовится к печати
Издательская группа РОНЦ

4. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ

*Е.В. Игнатьева, Н.А. Дмитричева, И.В. Ярцева,
Л.Г. Гатинская*

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОКТАСЕНСА В ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Октасенс – новый липофильный ФС ближнего инфракрасного диапазона, предназначенный для фотодинамической терапии злокачественных опухолей.

Для использования октасенса в качестве лекарственного средства, принимая во внимание его физико-химические свойства, в лаборатории разработки лекарственных форм была создана нестандартная наноструктурированная модель лекарственной формы, которая представляла собой водно-эмульсионную дисперсию октасенса. Однако при хранении эта лекарственная форма оказалась нестабильной. Поэтому в качестве модели была предложена лиофилизированная наноструктурированная ЛФ октасенса (НЛФО-лио).

Цель. Разработка методики количественного определения октасенса в предложенной модели ЛФ.

Материалы и методы. Образцы НЛФО-лио; УФ-спектроскопия.

Результаты и обсуждение. Для количественного определения использован метод спектрофотометрии в видимой области. В качестве растворителя использовали хлороформ. Известно, однако, что качество хлороформа оказывает существенное влияние на электронный спектр поглощения октасенса: если в хлороформе присутствуют следы соляной кислоты, наблюдается значительный батохромный сдвиг аналитического максимума и уменьшение его интенсивности. Для снятия этого нежелательного эффекта использовали хлороформ, предварительно обработанный поташом. Хлороформный раствор содержащего флакона стабилизируют добавлением 95 %-ного этилового спирта в соотношении 1: 1,5. Из 3 максимумов в электронном спектре поглощения октасенса (383 ± 3 нм, 655 ± 3 нм, 726 ± 3 нм) в качестве аналитического выбран максимум при 726 ± 3 нм. Установлено, что хлороформно-спиртовой раствор октасенса подчиняется закону Бугера Ламберта Бера в необходимом диапазоне концентраций 0,003–0,012 мг/мл. Содержание октасенса определяли измерением оптической плотности 0,0006 %-ных растворов октасенса (оптимальная концентрация) в максимуме поглощения при λ 726 ± 3 нм.

Предлагаемая методика обладает хорошей воспроизводимостью и точностью. Относительная ошибка определения не превышает 2,0 %.

Работа поддержана Правительством г. Москвы.

*И.В. Ярцева, Д.О. Ильин, Л.Г. Гатинская,
Н.А. Машалова, Е.В.Игнатьева*

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕЦИТИНА В ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛФ ТИОСЕНСА

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Тиосенс – практически нерастворимое в воде комплексное соединение алюминия из класса тиофталоглицинонов, полученное в ФГУП «ГНЦ «НИОПИК» и предназначенное для ФДТ опухолей. Для получения растворимой формы препарата и улучшения его фотодинамических и фармакокинетических свойств в лаборатории разработки лекарственных форм РОНЦ получена лиофилизированная липосомальная ЛФ тиосенса (ЛЛФТ-лио), представляющая собой многокомпонентную композицию, основой которой является яичный лецитин EPCS (Lipoid).

Цель работы – разработка методики количественного определения лецитина в ЛЛФТ-лио.

Результаты и обсуждение. Для количественного определения лецитина в ЛЛФТ-лио предложена спектрофотометрическая методика, основанная на способности фосфолипидов образовывать хорошо растворимые в хлороформе окрашенные комплексы с аммония ферроцианидом. Максимум поглощения комплекса, полученного с яичным лецитином

EPCS (Lipoid), регистрируется при λ 475 нм. Показано, что ингредиенты ЛЛФТ-лио, включая тиосенс, не оказывают существенного влияния на образование и спектральные характеристики комплекса лецитина с аммония ферроцианидом. Это позволяет для определения концентрации лецитина в ЛЛФТ-лио использовать калибровочный график, построенный посредством смешивания равных объемов водного раствора аммония ферроцианида и хлороформного раствора, содержащего увеличивающуюся концентрацию фосфолипида. В нашем случае калибровочный график включал 10 точек в диапазоне концентраций лецитина от 0,005 до 0,05 мг/мл. Получена линейная зависимость оптической плотности от концентрации лецитина в растворе. При более высоких концентрациях эта зависимость не подчиняется закону Бугера Ламберта Бера. Проанализированы липосомальные лекарственные формы тиосенса, содержащие в ЛЛФТ-лио 100; 300; 500 мг лецитина на единицу лекарственной формы. Определенная по калибровочному графику концентрация лецитина составила $c_1=0,0304$ мг/мл; $c_2=0,0396$ мг/мл; $c_3=0,0487$ мг/мл, а в пересчете на массу лецитина в единице лекарственной формы – $m_1=99$ мг; $m_2=304$ мг; $m_3=487$ мг, соответственно.

Выводы. Разработанная методика обладает достаточной точностью и воспроизводимостью. Относительная ошибка определения не превышает 2,0 %.

Работа поддержана Правительством Москвы.

Авторы благодарят Г.Н.Ворожцова, Е.А. Лукьянчу и В.М. Деркачеву за сотрудничество и предоставленные для исследования образцы тиосенса.

*Е.В. Игнатьева, Л.Г. Гатинская, С.Ф. Голубева,
Н.А. Дмитричева, И.В. Ярцева*

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛФ ТИОСЕНСА

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

В РОНЦ проводятся исследования по разработке лиофилизированной липосомальной ЛФ тиосенса (ЛЛФТ-лио) – препарата для ФДТ опухолей.

Цель работы – химико-фармацевтическая стандартизация ЛЛФТ-лио.

Материалы и методы. Образцы ЛЛФТ-лио, в которых в качестве криопротектора использована сахароза; УФ-спектроскопия, лазерная спектрометрия, потенциометрия.

Результаты и обсуждение. В процессе разработки ЛЛФТ-лио был изменен состав ЛФ (вместо лактозы использована сахароза) и технология ее получения. Эти изменения вызвали необходимость доработки методик химико-фармацевтического анализа и внесения уточнений в критерии и параметры качества ЛЛФТ-лио. Оценка качества проводилась по следующим критериям: описание, подлинность, средняя масса содержащего флакона, размер липосомальных везикул, рН, количественное определение.

Содержание тиосенса во флаконе определяли методом прямой спектрофотометрии. Наиболее воспроизводимые результаты получены при работе с хлороформно-спиртовыми растворами. Установлено, что сахароза, как и другие вспомогательные вещества, входящие в состав ЛЛФТ-лио, не имеют в этой области собственного поглощения, но влияют на положение аналитического максимума в спектре основного вещества. Обычно наблюдается

его батохромный сдвиг (до 8 нм) относительно спектра субстанции. Определение проводили в максимуме поглощения при λ 720±4 нм. Относительная ошибка определения не превышает 2,0 %. Также показано, что в представленной модели лекарственной формы изменились значения критериев качества «средняя масса содержимого флакона» и «рН». Основные показатели качества ЛЛФТ-лио приведены в таблице.

Таблица

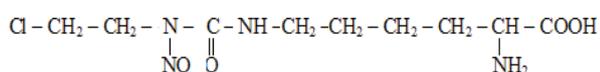
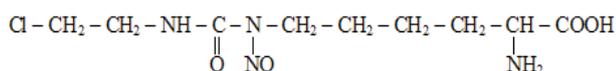
Основные показатели качества ЛЛФТ-лио

Описание	Подлинность	Средняя масса, г	рН	Размер ве- зикул, нм	Содержание во флаконе, мг
Сухая пористая масса светло-зеленого цвета	ЭСП должен иметь max поглощения при 342; 648; 720 нм	0,89–0,99	6,0–7,0	≤ 300	1,3–1,7

Работа поддержана Правительством г. Москвы

К. В. Костин, Е. В. Игнатъева, Н. А. Оборотова
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОТЕРЬ ЛИЗОМУСТИНА
В ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ДИСПЕРСИИ
ПРИ ФИЛЬТРУЮЩЕЙ ЭКСТРУЗИИ**
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Лизомустин – 2-хлорэтилнитрозоуреидопороиз-
водное аминокислоты лизин относится к группе
нитрозоалкилмочевин (НАМ) и представляет собой
смесь двух изомеров (активного и малоактивного):



Препарат синтезирован в ИОС УО РАН, в лабо-
ратории разработки лекарственных форм в РОНЦ
была предложена липосомальная лекарственная
форма лизомустина.

Задачи. Определить количество действующего ве-
щества остающегося на мембране фильтра экструдера.

Материалы и методы. Субстанция Лизомусти-
на – смесь изомеров положения нитрозогруппы:

9-(2-хлорэтил)-7-нитрозо-L-гомоцитруллин (I);

9-(2-хлорэтил)-9-нитрозо-L-гомоцитруллин (II).

(ФСП 42-0494003, ООО «АКАДЕМФАРМА»). Ли-
посомальная дисперсия Лизомустина, полученная в
лаборатории разработки лекарственных форм. Суб-
станцию и липосомальную дисперсию Лизомустина
экструдировали под давлением полуавтоматическим
экструдером Lixeh, последовательно пропуская их
через фильтры 400 нм и 220 нм. Снимали спектры
проектрированной и исходной частей.

Результаты и обсуждения. Оптические плот-
ности исходной субстанции и проэкструдированно-
го образца отличались в среднем на 0,005, а в слу-
чае липосомальной дисперсии на 0,025, что говорит
о незначительных потерях действующего вещества
при экструзии, которыми можно пренебречь.

Е.А. Котова, Н.А. Оборотова², И.И. Краснюк¹,
Т.В. Денисова¹

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ИЗГОТОВЛЕНИЯ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛП**

¹ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова, Росздрав, Москва

²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Задачи исследования.

1. Изучить и детально проанализировать под-

готовительные работы по проведению тех-
нологического процесса изготовления про-
тивоопухолевых лекарственных препаратов
в асептическом блоке лаборатории разра-
ботки ЛФ РОНЦ.

2. Усовершенствовать технологический процесс
изготовления и контроля качества ЛФ проти-
воопухолевых препаратов в асептическом
блоке с использованием модульного произ-
водства в соответствии с требованиями GMP.

Материалы и методы. С целью детального изу-
чения организации технологического процесса и
оценки их качества выбраны лекарственные формы
оригинальных отечественных противоопухолевых
субстанций из классов:

- Хлорэтиламины;
- Нитрозоалкилмочевины;
- комплексные производные металлов (плати-
на, кобальт).

Для организации усовершенствованного изготов-
ления провоопухолевых препаратов использован
комплекс методов:

- физико-химические,
- биологические,
- микробиологические,
- математико-статистические.

Результаты. В РОНЦ исследованы подгото-
вительные работы и организация технологического
процесса изготовления отечественных противоопу-
холевых препаратов с использованием модульного про-
изводства в асептическом блоке. Изготовление осу-
ществляют в чистых помещениях класса А в соответ-
ствии с требованиями Национального стандарта РФ
ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и кон-
троля качества лекарственных средств». Противоопу-
холевым веществам свойственны: термоллабильность,
гидролитическая неустойчивость, гигроскопичность.
Для получения стабильных лекарственных препара-
тов из таких субстанций, рационально применять сте-
рилизацию фильтрованием и последующее изготов-
ление в виде лиофилизированных препаратов.

Данный процесс не требует поведения финишной
стерилизации и в сухой массе не поддерживает рост
микроорганизмов. С целью обеспечения всех требо-
ваний ГОСТ Р и защиты персонала и производствен-
ной среды от токсичных субстанций хлорэтиламинов
используют изоляторы (барьерные технологии).

Помимо упрощения технологического процесса и
повышения качества изготавливаемых лекарственных
препаратов, введение современного модульного про-
изводства позволяет сокращать эксплуатационные
расходы.

В.П. Краснов¹, Н.А. Оборотова², М.И. Кодеес¹,
З.С. Шпрах², Г.Л. Левит¹, К.Костин², М.А.Ежикова¹,
О.Н. Саквина², А.Ю. Барышников²

**АНАЛИЗ МЕТОДОМ ¹H-ЯМР СОСТАВА
ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ЛИЗОМУСТИНА**
¹ИОС им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург
²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Введение. Для отработки технологических процессов получения липосомальной лекарственной формы препарата лизомустин необходим метод анализа, позволяющий провести быструю оценку состава полученного продукта. Липосомальная форма препарата лизомустин включает лецитин (фосфатидилхолин), лактозу, холестерин и лизомустин (соотношение изомеров **1** и **2** около 75:25).

Целью настоящей работы была разработка метода количественной оценки перечисленных компонентов методом ¹H-ЯМР спектроскопии.

Материалы и методы. В исследовании использовали липосомальную лекарственную форму лизомустина, полученную в лаборатории разработки лекарственных форм РОНЦ. Спектры записывали на спектрометре ЯМР DRX400 "Bruker" (рабочая частота 400 МГц), в качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан (TMS).

Результаты. Показано, что для проведения анализа наиболее подходящим растворителем, в котором растворяются все компоненты лекарственной формы, является смесь дейтерированного ДМСО с СС1₄.

Спектры отдельных компонентов ЛФ: лецитина, холестерина и лактозы, а также лизомустина – характеризуются значительным перекрытием сигналов протонов однотипных групп, что усложняет интерпретацию. Однако нам удалось количественно оценить мольное соотношение компонентов лекарственной формы. Диагностическими сигналами являются сигналы метильной СН₃-группы в 17 положении холестерина (δ 0,65 м.д., триплет), сигнал метинового СН-протона фрагмента глицерина в лецитине (5,0 м.д., мультиплет) и сигналы мочевиновых NH-протонов изомеров лизомустина (9,0-8,7 м.д., триплеты). Точность определения составляет около 1,5 %.

Выводы. Таким образом, показано, что на основании анализа ¹H ЯМР-спектров можно определить содержание холестерина, лецитина и изомеров лизомустина в липосомальной ЛФ препарата.

Работа выполнена при финансовой поддержке Уральского отделения РАН (проекты 09-П-3-2001 и 09-И-3-2004) и Ведущих научных школ (НШ-65261.2010.3).

Михаевич Е.И., Полозкова А.П., Партолина С.А.,
Орлова О.Л., Смирнова Л.И.

**РАЗРАБОТКА ЛФ ЦИФЕТРЕЛИНА
ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ**
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Введение. Цифетрелин – аналог гипоталамического гормона соматостатина, отобран по результатам изучения гормональной, цитотоксической и противоопухолевой активности для доклинического изучения. К настоящему времени оптимизирован метод синтеза и наработано несколько серий Цифетрелина, на основе которых разработан проект ФСП на субстанцию.

Одним из главных элементов доставки лекарственного вещества является путь введения, определяющий многие стороны его взаимодействия с организмом. В предварительном экспериментальном изучении нерастворимой в воде субстанции наибольший, хорошо воспроизводимый противоопухолевый эффект был получен при внутрибрюшинном введении их водной суспензии.

Дальнейшее изучение препарата в опытах *in vivo* показало, что при пероральном введении противоопухолевый эффект был сравним с подкожным, внутривенным и внутривенным путях введения. Учитывая, что для больного наиболее удобен и безопасен прием препарата внутрь, целью работы являлась разработка ЛФ Цифетрелина для перорального введения.

Материалы и методы. Субстанция Цифетрелина синтезирована в лаборатории химического синтеза и соответствовала по критериям качества требованиям проекта ФСП. При изготовлении модельных смесей для таблетирования были использованы вспомогательные вещества, разрешенные для использования в лекарственных формах для приема внутрь и соответствующие нормативной документации. Для разработки пероральной лекарственной формы Цифетрелина использовали таблеточный пресс и приборы для определения технологических характеристик порошков фирмы «Erweka», Германия.

Результаты. Исследованы технологические характеристики субстанции Цифетрелина: фракционный состав, форма и соотношение параметров размера частиц, смачиваемость, насыпная масса, сыпучесть или подвижность, прессуемость. Исследуемая субстанция относится к группе не смачивающихся веществ, в связи с чем в рецептуру смеси для таблетирования были введены ингредиенты, ответственные за улучшение распадаемости таблетки и снижение адгезии к прессующему инструменту. При исследовании текучести, угла естественного откоса оказалось, что субстанция Цифетрелина в связи с рядом причин, в том числе сильной электризуемостью, плохо и нестабильно высыпается из вибрирующей воронки. Поэтому можно говорить лишь о приближенном значении коэффициента текучести (0,1 г/сек). С целью улучшения текучести порошков необходимо увеличение фракции укрупненных и утяжеленных частиц. Это достигалось гранулированием 2% крахмальным клейстером и созданием смеси, содержащей более крупные и тяжелые частицы.

Таким образом, разработан состав ЛФ Цифетрелина в виде таблеток, удовлетворяющий требованиям ГФ XII по всем исследуемым разделам.

Н.А. Оборотова

**РАЗРАБОТКА
НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ЛФ
ОТЕЧЕСТВЕННЫХ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СУБСТАНЦИЙ**
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Одним из направлений повышения эффективности лекарственной терапии ЗНО является совершенствование избирательности действия противоопухолевых препаратов с помощью современных фармацевтических технологий. Мы использовали коллоидные системы, позволяющие изменить фармакокинетику водорастворимых лекарственных веществ путем включения их во внутреннее пространство липосомы, либо солиubilизировать гидрофобные субстанции, включая их в липидную фракцию мицелл и липосом.

Целью исследования. Создание наноструктурированных ЛФ для внутривенного введения оригинальных отечественных противоопухолевых субстанций.

Результаты. Лизомустин как водорастворимое производное нитрозоалкилмочевины наряду с высокой противоопухолевой активностью обладает низким терапевтическим индексом. С целью увеличения избирательности его противоопухолевого действия нами разработаны стерически стабилизированные липосомы, позволившие расширить диапазон терапевтических доз и снизить токсичность цитостатика.

Интересные результаты получены инкапсулированием в липосомальную мембрану липофильных гормоноцитостатиков (кортифена, тестифенона и цитэстрол-ацетата) и гидрофобных производных хлорэтиламинов (цифелина и амирона). В этом случае удалось получить коллоидные системы, пригодные для всех способов введения, в том числе и для внутривенного применения, чем значительно расширяются терапевтические возможности испытываемых соединений.

Многие фотосенсибилизаторы, представляющие интерес для ФДТ и флуоресцентной диагностики с точки зрения высоких значений экстинции и квантового выхода синглетного кислорода, удобного спектрального диапазона и флуоресцентных свойств, нерастворимы в воде. Поэтому мицеллярные и липосомальные формы таких соединений использованы нами в самом начале их биологического изучения и скрининга, как возможные инъекционные лекарственные формы для ФДТ.

Выводы. Проведенные нами технологические и химико-фармацевтические исследования позволяют производить стандартные и воспроизводимые серии липосомальных препаратов для углубленного доклинического изучения.

Д.В. Соколова, Е.В. Тазина, М.А. Кортава, О.В. Хугаева, А.П. Полозкова, П.К. Иванов, А.С. Гриневич, И.В. Чинарева, Н.А. Оборотова, А.Ю. Барышников

АНТИ CD-20 И АНТИ-HLA-DR ИММУНОЛИПОСОМАЛЬНЫЕ ФОРМЫ ДОКСОРУБИЦИНА: ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И АНТИГЕНСПЕЦИФИЧНОСТЬ IN VITRO
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Терапевтические подходы к совершенствованию химиотерапии онкологических заболеваний сфокусированы на разработке новых систем доставки лекарств непосредственно к злокачественной клетке. С этой целью широко изучаются иммунолипосомальные конструкции, которые позволяют увеличить избирательность действия хорошо известных противоопухолевых соединений.

Цель исследования. Получение анти-CD20 и анти-HLA-DR иммунолипосом, нагруженных доксорубицином, для адресной доставки к опухолевым клеткам-мишеням.

Материалы и методы. Иммунолипосомы получали методом обращения фаз из лецитина, холестерина, пегилированного 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DSPE-PEG –2000), и pNp-PEG lipid в мольных соотношениях 7:4:0,15:0,05. Загрузку доксорубицина осуществляли против градиента сульфата аммония. Весовое соотношение препарат: липиды составило 0,16:1.

В качестве вектора использовали МКА ICO-180 и ICO-1, обладающие специфичностью к CD20 и HLA-DR антигенам соответственно. Очистку иммунолипосомальной суспензии осуществляли методом гель-фильтрации с помощью хроматографической колонки, заполненной сефадексом G-50. Содержание препарата определяли спектрофотометрически. Калибровку иммунолипосом по размеру проводили с помощью ручного мини-экструдера. Размер везикул определяли на приборе Submicron Particle Sizer Nicomp-380 (США). Определение общего белка в препарате иммунолипосом проводили с бидинхониновой кислотой и рассчитывали количество молекул МКА, приходящееся на липосому.

Оценку специфичности связывания иммунолипосом проводили на клеточной линии Raji (лимфома Беркитта) с помощью непрямого иммуофлюоресцентного метода.

Результаты. Включение доксорубицина в иммунолипосомы составило 89–95%; размер везикул – 145 ± 5 нм; количество молекул МКА, приходящееся на одну липосому – 90 ± 3 .

Специфичность связывания анти-CD20 иммунолипосом с антигенположительными клетками-мишенями составила $98 \pm 2\%$, анти-HLA-DR иммунолипосом, $96 \pm 3\%$.

Выводы. Отработана технология получения анти-CD20 и анти-HLA-DR иммунолипосомальных форм доксорубицина с высокой степенью включения препарата и выраженной антигенспецифичностью *in vitro*.

Е.В. Тазина, А.П. Полозкова, Е.В. Игнатьева, О.Л. Орлова, Н.А. Оборотова

СТЕРИЛИЗУЮЩАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ ТЕРМОЛИПОСОМАЛЬНОЙ ДИСПЕРСИИ С ДОКСОРУБИЦИНОМ
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Введение. Важным моментом в разработке инъекционных липосомальных препаратов является выбор метода стерилизации. В связи с термолабильностью и гидролитической неустойчивостью противоопухолевых веществ, а также подверженностью липидов, образующих липосомальную мембрану, гидролизу и перекисному окислению, большинство существующих стерилизационных методов (термических) неприемлемо для производства лекарственных средств на основе липидных везикул. Наиболее часто стерилизацию липосом проводят с помощью фильтрации через ядерные мембранные фильтры с последовательным уменьшением величины пор от 1,2 мкм до 0,22 мкм.

Цель исследования. Разработка методики стерилизующей фильтрации термолипосомальной дисперсии с доксорубицином.

Материалы и методы. Термолипосомы (ТЛ) получали методом обращения фаз из липидов (DPPC и DSPC), холестерина, пегилированного липида в молярном соотношении 9:1:0,2:0,02. ТЛ экструдировали через нейлоновые мембранные фильтры с размером пор 0,45 мкм и 0,22 мкм, а затем через поликарбонатные мембранные фильтры с размером пор 0,2 мкм. Доксорубицин (Докс) загружали в ТЛ против градиента сульфата аммония. Весовое соотношение препарат : суммарные липиды составило 0,2 : 1, общее содержание липидов в дисперсии – 12,6 мг/мл. Для очистки Докс-ТЛ от не включившегося в ТЛ препарата использовали метод гель-фильтрации. Содержание Докс и эффективность включения Докс в ТЛ определяли спектрофотометрически при длине волны 252 нм на приборе Cary 100 (Varian, Inc., Австралия). Диаметр везикул измеряли на наносайзере Nicomp-380 Submicron Particle Sizer (США). Фильтрующий материал для Докс-ТЛ выбирали с учетом физико-химических свойств веществ, входящих в состав лекарственной формы. Свежеприготовленную дисперсию Докс-ТЛ последовательно пропускали через нейлоновые мембранные фильтры с размером пор 0,45 мкм и 0,22 мкм под давлением, используя установку LIPEX™ (Northern Lipids, Inc., Канада).

Результаты. Включение Докс в ТЛ и размеры частиц до и после стерилизующей фильтрации практически не изменились.

До фильтрации содержание Докс в ТЛ составило 2,12 мг/мл, после – 2,04 мг/мл. Следовательно, в процессе стерилизующей фильтрации термолипосомальной дисперсии происходили потери около 3,8 % Докс.

Выводы. Стерилизацию дисперсии Докс-ТЛ можно проводить с помощью фильтрации под давлением через нейлоновые мембранные фильтры с последовательным уменьшением величины пор от 0,45 мкм до 0,22 мкм. Потери Докс при этом не превышают 4 %.

О.В. Хугаева, М.А. Кортава, Д.В. Соколова, Е.В. Тазина, Е.В. Игнатьева, А.П. Полозкова, А.Ю. Барышников, Н.А. Оборотова, И.И. Краснюк
ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО КРИОПРОТЕКТОРА ДЛЯ ЛИОФИЛИЗАЦИИ ЛИПОСОМАЛЬНОГО МИТОКСАНТРОНА
 РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Главное препятствие при использовании липосом в практике – низкая стабильность. Изменения в процессе хранения связаны с изменением размеров везикул; разрушением липидного бислоя и внутреннего содержимого; вытеканием включенного лекарства; окислением, гидролитическим разрушением липидного состава или ЛП и т.п. Кроме физической и химической стабильности дисперсионной липосомальной системы необходимо обеспечить ее стерильность в процессе хранения препарата. Сегодня широко используется сублимационная сушка при получении инъекционных ЛФ термостабильных и гидролитически неустойчивых лекарственных соединений ряда вакцин и других биопрепаратов.

Цель. Подобрать оптимальный криопротектор для лиофилизации липосом, нагруженных митоксантроном, для обеспечения стабильности препарата при дальнейшем его хранении.

Материалы и методы. Для получения липосомальной дисперсии для лиофильной сушки использовали лецитин, полиэтиленгликоль (mPEG-2000-DSPE) фирмы Lipoid; холестерин (Chol; Sigma); митоксантрона гидрохлорид (Synbias Pharma Ltd); сахароза, глюкоза, лактоза (Химмед). Как криопротекторы при лиофильной сушке использовали лактозу, сахарозу и глюкозу (все по 3–4–6 %) в определенных процентных содержаниях. Липосомальную дисперсию разливали по 2 мл во флаконы емкостью 20 мл и замораживали на полке сублимационной сушки до –45 °С в течение 3 ч. Далее проводили сублимацию на установке Minifast DO2 (Англия-Италия) в течение 24 ч.

Проводили оценку влияния температурного режима сушки на качество готового препарата: внешний вид (цвет, пористость, однородность), физико-химические характеристики (скорость растворения или ресуспендирования, размер везикул и т.п.).

Результаты. На основании проведенных исследований в качестве наиболее оптимального криопротектора для лиофилизации липосомального митоксантрона выбрана 4 %-ная сахароза. Размер везикул до лиофилизации составил 146±2 нм, после – 157±5 нм. Эффективность включения митоксантрона в липосомы после лиофильной сушки изменилась так же незначительно (от 93 до 84,2 %).

О.В. Хугаева, М.А. Кортава, Д.В. Соколова, А.П. Полозкова, А.Ю. Барышников, Н.А. Оборотова, П.К. Иванов, А.С. Гриневич, И.В. Чинарева, И.И. Краснюк
ПОЛУЧЕНИЕ ИММУНОЛИПОСОМАЛЬНОГО МИТОКСАНТРОНА
 РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Проблема создания новых противоопухолевых препаратов является одной из самых актуальных в

современной онкологии. Отсутствие достаточной избирательности действия известных цитостатиков обуславливает не только дальнейший поиск новых активных соединений, но и совершенствование их лекарственных форм. Как показали доклинические и клинические испытания, основным недостатком противоопухолевых препаратов является невысокая избирательность цитостатического действия на опухолевые клетки и отсюда значительная общая токсичность.

Поэтому остается актуальной проблема создания рациональных лекарственных форм, увеличивающих избирательность их противоопухолевого действия.

С этой целью в последние годы все чаще предпринимаются попытки разработки систем направленной доставки. Большой интерес представляют иммунолипосомы, позволяющие программировать время нахождения препарата в кровотоке и его накопление в опухоли.

Цель исследования. Разработать технологию получения иммунолипосомального митоксантрона, способствующего увеличению избирательности противоопухолевого действия препарата.

Материалы и методы. Для получения иммунолипосомальной дисперсии использовали лецитин (PC), полиэтиленгликоль (mPEG-2000-DSPE и pNp-PEG-3000 lipid) фирмы Lipoid; холестерин (Chol) (Sigma); антигенспецифичные МКА (РОНЦ РАМН); митоксантрона гидрохлорид (Synbias Pharma Ltd).

Имунолипосомы с митоксантроном получали методом активной загрузки по градиенту сульфата аммония. Очистку иммунолипосомальной дисперсии от невключенного митоксантрона проводили методом колоночной хроматографии (гель-фильтрация). Контроль разделения фракций осуществляли с помощью проточного УФ-спектрометра UVis-920. Эффективность включения митоксантрона в иммунолипосомы оценивали спектрофотометрическим методом при длине волны λ 242±2 нм. Размер иммунолипосом измеряли на приборе Submicron Particle Sizer Nicomp-380 (США). Проверяли способность иммунолипосом специфически связываться с антигенами, экспрессированными на клетках линии Raji (В-клеточная лимфома человека) *in vitro*.

Результаты. Средний диаметр иммунолипосом составил 150±5 нм, включение митоксантрона в иммунолипосомы – 90%.

Эффективность связывания иммунолипосом с клетками линии Raji составила 97,4%.

Чан Тхи Хай Иен¹, Е.В. Тазина², В.М. Печенников¹, А.П. Полозкова², Н.А. Оборотова², Г.В. Раменская¹

ПРИМЕНЕНИЕ ТСХ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛФ ФОТОДИТАЗИНА
¹ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова, Москва,
²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Введение. В РОНЦ разработана новая липосомальная ЛФ фотодитазина. ТСХ, отличающаяся скоростью и простотой выполнения, часто применяется для качественного анализа лекарственных препаратов.

Цель исследования. Разделение и идентификация яичного фосфатидилхолина и фотодитазина в липосомальной ЛФ фотодитазина методом ТСХ.

Материалы и методы. Проводили ТСХ на хроматографических пластинках «Silica gel 60 F 254» 10×20 см (подложка – стекло) (Merck, Германия).

Использовали 3 системы растворителей

I. хлороформ : метанол : вода (65:25:4).

II. Н-бутанол: ледяная кислота: вода (12:3:5)

III. Хлороформ: метанол : ледяная уксусная кислота : вода (25 : 15 : 4) (60 : 50 : 1 : 4).

Содержимое флакона, содержащего лиофилизированный липосомальный фотодитазин, растворится в 1 мл 95 %-ного этилового спирта.

На хроматографическую пластинку наносят 5 мкл приготовленного раствора липосомального фотодитазина и стандартных образцов веществ-свидетелей.

Пластинку с нанесенными пробами выдерживают на воздухе в течение 5–10 мин, затем помещают в камеру, предварительно насыщенную вышеуказанной смесью растворителей, и хроматографируют восходящим способом.

При достижении фронтом растворителей расстояния 10 см, пластину вынимают из камеры и сушат на воздухе до полного удаления следов растворителей. Как детектор используют пары йода.

Пятна яичного фосфатидилхолина идентифицировали по желтой окраске, а пятна фотодитазина – по зеленой окраске.

Результаты.

1. Система I. Наблюдали четкое разделение фосфатидилхолина ($R_f = 0$) и фотодитазина (R_f около 0,9).
2. Система II. Также наблюдали четкое разделение фосфатидилхолина (R_f около 0,4) и фотодитазина (R_f около 0,8).
3. Система III. Фосфатидилхолин и фотодитазин не разделялись.

Таким образом, для разделения и идентификации фосфатидилхолина, фотодитазина в липосомальной ЛФ фотодитазина методом ТСХ рекомендованы системы I и II с использованием детектора пары йода.

Издание 2-е, переработанное и дополненное

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ



Готовится к печати
Издательская группа РОНЦ

5. ФДТ

Алексеев Ю.В.³, Пономарев Г.В.¹, Лихачева Е.В.³,
Муравьев М.В.², Мазур Е.М.³, Карандашов В.И.³,
Луковкин А.В.³, Николаева Е.В.³

¹ГУ НИИ БМХ РАМН им. Ореховича, Москва

²ООО «Панков Медикл»

³ФГУ «ГНЦ Лазерной Медицины ФМБА России», Москва

Метод ФДТ более 7 лет входит в состав широкого спектра лазерных технологий, с успехом применяемых в поликлинике ФГУ «ГНЦ Лазерной Медицины ФМБА России». Нами впервые разработаны методики применения ФДТ в амбулаторной оториноларингологии при лечении неопухолевых заболеваний ЛОР-органов и в лечении болезней кожи. Одним из оснований для использования ФДТ в лечении неонкологических заболеваний является такое свойство фотосенсибилизаторов, как избирательное накопление тканями с высокой пролиферативной активностью, таковыми являются воспалительно-измененные ткани. В нашем исследовании использовались тетрапирролы хлоринового ряда на основе хлорина еб.

I. ФДТ ХРОНИЧЕСКИХ РИНИТОВ И РИНОСИНУСОПАТИЙ

В качестве источников излучения использовались светодиодный матричный прибор «АСТ» (λ 400 нм), лазерный аппарат «Лахта-Милон» и «Утро» (λ 660 нм). Было пролечено 263 пациента в возрасте от 14 лет, получены результаты: выздоровление (стойкая ремиссия, наблюдаемая в катамнезе) – 138 (52,5%), значительное улучшение состояния – 101 (38,4%), без клинически выраженного эффекта – 4 (1,5%) пациента.

Для контроля эффективности ФДТ применялась установка лазерная электронно-спектральная ЛЭСА-01-БИОСПЕК. Проводилось измерение флуоресценции до и после облучения. В результате облучения тканей АСТ снижение флуоресценции составляло около 80%, а после воздействия «Лахта-Милон» – около 60%, что говорит о высоком уровне терапевтического воздействия. Процедуры безболезненны, хорошо переносятся пациентами. Отмечается улучшение носового дыхания часто уже после первой процедуры, курс лечения составляет от 2 до 5 процедур. Возможно проведение в амбулаторных условиях всего курса лечения, что является очень важным экономическим фактором.

Применение фотодинамической терапии также позволяет значительно сократить потребность в медикаментозной терапии. Для улучшения эффективности мы можем применять комбинированное лазерное лечение – сочетание вышеуказанных методов (например, фотодинамическая терапия + коагуляция хирургическим лазерным лучом), за счет этого мы добиваемся максимальных результатов – у 96% пациентов наступает полное излечение или длительная ремиссия. Метод фотодинамической терапии является высокоэффективным и неинвазивным методом лечения неонкологических заболеваний ЛОР-органов, в том числе хронических ринитов и риносинусопатий.

II. РАЗРАБОТКА УСТРОЙСТВА ДЛЯ ФДТ В СИНЕМ ДИАПАЗОНЕ СПЕКТРА

Задачи. Создание устройства для проведения фотодинамической терапии дерматологических заболеваний в связи с тем, что в последние годы ФДТ, основанную

на использовании фотосенсибилизатора и светового излучения в спектре его поглощения, применяют не только в онкологии, но и при различных инфекционных заболеваниях кожи и мягких тканей и при ряде неонкологических дерматологических заболеваний. При ФДТ большинства неонкологических дерматологических заболеваний большой глубины проникновения оптического излучения не требуется, поэтому эффективно применение некогерентных источников излучения с максимумами в длинноволновом ультрафиолетовом, фиолетовом, синем диапазонах с меньшей глубиной проникновения в ткани.

Следовательно, очевидна необходимость проведения исследований по созданию новых и модернизации уже используемых для фотодинамической терапии некогерентных источников излучения для проведения ФДТ дерматологических заболеваний, проблема лечения которых остается актуальной в настоящее время и требует поиска новых эффективных и экономичных методов терапии.

Материалы и методы. В связи с этим нами разработаны устройства с некогерентным излучением в синем диапазоне спектра (излучающие в полосе Соре) и с увеличенной площадью облучения. Для этого модернизирована лампа Минина с поляризующим эффектом, состоящая из корпуса, в котором находится источник синего света с отражателем, в качестве источника света использована матрица светоизлучающих диодов, совмещенная с пластиной-поляризатором света, кроме того, в корпусе устройства имеется гнездо для штекера зарядного устройства аккумулятора.

Заключение. Создан прибор для проведения фотодинамической терапии с некогерентными источниками излучения в синем диапазоне спектра, подтвержденный патентом на полезную модель.

Выводы. Применение устройства может быть использовано для проведения фотодинамической терапии с фотосенсибилизаторами производными тетрапирролов хлоринового ряда, имеющими спектры поглощения в синем диапазоне излучения.

III. РАЗРАБОТКА УНИВЕРСАЛЬНОГО ТРЕХВОЛНОВОГО ЛАЗЕРНО-ДИОДНОГО МЕДИЦИНСКОГО УСТРОЙСТВА

Задачи. Создание устройства для проведения ФДТ и получения фотохимического эффекта с образованием синглетного кислорода в связи с тем, что доказан эффект образования синглетного кислорода при применении излучения λ 1270 нм, что является перспективным для изучения фотохимического эффекта данных λ в биологических тканях. В проводимых ранее экспериментах на животных установлено быстрое разрешение воспалительных процессов и регенерацию поврежденных биологических тканей при применении лазерного излучения с указанными параметрами.

Материалы и методы. В связи с вышеизложенным нами разработано устройство, оптические излучатели которого подобраны в диапазонах λ 380-420 нм; 630-688 нм; 1264-1273 нм и с мощностями излучения 5 и 10 Вт соответственно, причем λ излучения второго канала соответствует λ второй гармоники излучения третьего канала. Универсальное лазерно-диодное трехволновое медицинское устройство, содержит блок питания, панель управления с цифровым жидкокристаллическим экраном, оптические излучатели, съюстированные с выводящими световодами моноволоконных излучателей.

Результаты. Создана полезная модель устройства для проведения ФДТ и получения фотохимического эффекта с образованием синглетного кислорода. Получен патент на полезную модель.

Выводы. Данный прибор планируется использовать для проведения ФДТ различных заболеваний с фотосенсибилизаторами (производными гематопрорфина и хлоринов еб), поглощающими световое излучение в имеющемся диапазоне длин волн. Использование λ 1264 и 1273 нм для прямой генерации синглетного кислорода в биологических объектах также представляет определенный интерес как при самостоятельном применении, так и в сочетании с ФДТ.

IV. ПРИМЕНЕНИЕ НЕКОГЕРЕНТНЫХ ИСТОЧНИКОВ В СИНЕМ ДИАПАЗОНЕ СПЕКТРА В ЛЕЧЕНИИ СТРЕПТОСТАФИЛОДЕРМИЙ

Цели. Исследование возможности применения ФДТ с некогерентными источниками излучения в синем диапазоне спектра при стрептостафилодермиях. Фотосенсибилизаторы и источники излучения для проведения клинических испытаний были подобраны на основании микробиологических, спектрофотометрических исследований, а также исследований на животных.

Материалы и методы. ФДТ проводилась 52 пациентам с поверхностными формами стрептостафилодермий (28 мужчин и 24 женщины) в возрасте от 17 до 58 лет. Контрольную группу составили 54 пациента (28 мужчин, 26 женщин), получавших традиционную терапию. ФДТ проводили с наружным применением фотосенсибилизатора 1 %-ного геля «Фотодитазин», который наносили на пораженные участки кожи за 1 час до облучения.

В качестве источника излучения использовали аппарат светодиодный терапевтический «АСТ» (регистрационный № ФСР2008/02720) с излучением в диапазоне 400–410 нм (в полосе Соре), с мощностью излучения 500 мВт. Режим процедур – 3 раза в неделю, время облучения от 5 до 7 минут на расстоянии 5 см от источника излучения.

Результаты исследования оценивались по изменению клинической картины, методами биофотометрии с применением биофотометра «Милта-08-1», зафиксированы в виде фотоматериалов.

Результаты. В процессе проводимого исследования отмечен полный регресс высыпаний у 78 % пациентов, значительное клиническое улучшение у 25,5% пациентов, без изменений – у 12% больных. со стрептостафилодермиями после 4–8 процедур ФДТ (через 1,5–2,5 нед. после начала терапии), у пациентов контрольной группы – 15; 58 и 63 % соответственно. Данные подтверждены результатами биофотометрических исследований пораженных участков кожи: отмечалось снижение КОП (коэффициента отражения с поверхностных слоев кожи) на 38 %, КОГ (коэффициента отражения с глубоких слоев кожи) на 24% после проведения ФДТ, у пациентов контрольной группы КОП снижался на 25 %, КОГ – на 18 %. В течение 12 мес. отсутствие рецидивов после проведения ФДТ отмечали у 74 % пациентов, у пациентов контрольной группы – 18 %.

Выводы. Применение ФДТ с фотосенсибилизаторами хлороинового ряда при лечении стрептостафилодермий позволяет добиваться значительных улучшений состояния пациентов и ремиссий в значительно более короткие сроки, чем при применении традиционной терапии.

V. РАЗРАБОТКА УСТРОЙСТВА ДЛЯ ФДТ В СИНЕМ ДИАПАЗОНЕ СПЕКТРА

Задачи. Создание устройства для проведения ФДТ дерматологических заболеваний в связи с тем, что в последние годы терапию, основанную на использовании фотосенсибилизатора и светового излучения в спектре его поглощения, применяют не только в онкологии, но и при различных инфекционных заболеваниях кожи и мягких тканей и при ряде неонкологических дерматологических заболеваний. При ФДТ большинства неонкологических дерматологических заболеваний большая глубина проникновения оптического излучения не требуется, поэтому эффективно применение некогерентных источников излучения с максимумами в длинноволновом ультрафиолетовом, фиолетовом, синем диапазонах с меньшей глубиной проникновения в ткани и требует проведения исследований по их применению. Следовательно, очевидна необходимость проведения исследований по созданию новых и модернизации уже используемых для фотодинамической терапии некогерентных источников излучения для проведения ФДТ дерматологических заболеваний, проблема лечения которых остается актуальной в настоящее время и требует поиска новых эффективных и экономичных методов терапии.

Материалы и методы. В связи с этим нами разработаны устройства с некогерентным излучением в синем диапазоне спектра (излучающих в полосе Соре) и с увеличенной площадью облучения. Для этого модернизирована лампа Минина с поляризующим эффектом, состоящая из корпуса, в котором находится источник синего света с отражателем, в качестве источника света использована матрица светоизлучающих диодов, смещенная с пластиной-поляризатором света, кроме того в корпусе устройства имеется гнездо для штекера зарядного устройства аккумулятора.

Заключение. Создан прибор для проведения ФДТ с некогерентными источниками излучения в синем диапазоне спектра, подтвержденный патентом на полезную модель.

Выводы. Применение устройства может быть использовано для проведения ФДТ с фотосенсибилизаторами производными тетрапирролов хлороинового ряда, имеющими спектры поглощения в синем диапазоне излучения.

С.А. Аминов¹, М.Л. Гельфонд²

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД В ИСПОЛЬЗОВАНИИ ФДТ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ЦЕНТРАЛЬНОГО НМРЛ

¹ГУЗ ИООД, Иваново

²ФГУ НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, С-Петербург

Задача исследования. Определение эффективности двухэтапного применения ФДТ в лечении больных центральным НМРЛ.

Материалы и методы. На 1 этапе проводилась эндобронхиальная (ЭБ) ФДТ у 20 больных центральным НМРЛ II–IIIА стадии, препаратом Фотодитазин (1 мг/кг) и лазерным воздействием аппаратом «Аткус 2» через 2 ч, плотность энергии 300 Дж/см². На 2 этапе этим больным выполнялось хирургическое вмешательство с интраоперационной (ИО) ФДТ. Использовали Фотодитазин (1 мг/кг) и аппарат «Аткус 2», плотность энергии 40 Дж/см². При этом в поле облучения входили зона медиастинальной лимфодиссекции, культи бронха и париетальная плевра.

Оперативное вмешательство проводилось через 3–4 недели после первого этапа ФДТ. Оперативные вмешательства проводились по стандартной методике с выполнением медиастинальной лимфодиссекцией на стороне операции. В контрольной группе (20 человек) проводились аналогичные операции без ФДТ.

Результаты. Применение ЭБ ФДТ уменьшило эндобронхиальную распространенность опухоли у всех больных, что позволило из 11 пациентов, которым предполагалось выполнение пневмонэктомии, 8 выполнить лобэктомию, а 3 – лобэктомию с резекцией и пластикой бронхов. В одном случае ЭБ ФДТ позволила выполнить пневмонэктомию без резекции бифуркации трахеи.

При проведении ИО ФДТ ранних послеоперационных осложнений, связанных со световым воздействием, зафиксировано не было. Фотодинамическая терапия увеличивала время операции на 15–20 минут. Срок наблюдения 2 года. Признаков рецидива опухоли не выявлено. В контрольной группе у 3 пациентов зафиксирован местный рецидив опухоли.

Выводы. Применение эндобронхиальной и интраоперационной фотодинамической терапии оправдано для улучшения результатов лечения местнораспространенного НМРЛ.

Аминодова И.П., Аминов С.А.

ФДТ ПРЕИНВАЗИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ШМ ГУЗ «ИООД», Иваново

РШМ занимает 2 место среди опухолей женской половой сферы. Рост заболеваемости у пациенток репродуктивного возраста обуславливает разработку органосохраняющих методов лечения.

Задачи исследования. Оценить эффективность лечения CIN II-III и *carcinoma in situ* ФДТ.

Материалы и методы. Проведено лечение 36 пациенток с преинвазивными формами патологии шейки матки, развившимися на фоне инфицирования ВПЧ 16; 18 типов. Обследование включало расширенную кольпоскопию, цитологическое и морфологическое исследование, ПЦР-тестирование на ВПЧ 16; 18 типов. Препарат «Фотодитазин» вводился внутривенно в дозе 0,8–1 мг/кг веса с последующим лазерным облучением при плотности энергии 250 Дж/см². Медикаментозная противовирусная терапия не проводилась.

Результаты. Ни одна из пациенток при проведении ФДТ не предъявляла жалоб на выраженные болевые ощущения. Через 1 месяц у 20 пациенток при КСК отмечена полная эпителизация шейки матки, у 7 – незавершенная эпителизация с признаками эндоцервицита, у 6 – воспаление экто- и экзоцервикса, у 3 – йод-негативные участки. При цитологическом исследовании у 24 женщин (66,7%) имела место воспалительная цитограмма, у 6 (16,7%) выявлены ASCUS клетки, в 4 случаях (11,1%) цитологическое исследование не выявило патологический изменений, у 2 обследованных (5,5%) отмечена дисплазия плоского эпителия. Спустя 3 месяца после лечения у всех пациенток при КСК отмечена полная эпителизация шейки матки, отсутствие атипических клеток при цитологическом исследовании. Нормальная кольпоскопическая картина отмечена у 26 пациенток (72, 2%). ПЦР-исследование на ВПЧ во всех случаях было отрицательным. Через 6 месяцев после лечения у всех женщин при КСК и цитологическом исследовании не обнаружено признаков рецидива заболевания. Рубцовой деформации шейки матки не отмечено ни в одном из наблюдений. При ПЦР-исследовании ВПЧ 16, 18 типа не обнаружено.

Выводы. ФДТ преинвазивных заболеваний ШМ – высокоэффективный метод лечения, позволяющий совместить органосохраняющий подход с принципами радикальной терапии. Особого внимания заслуживает противовирусный эффект ФДТ, который обеспечивает профилактику рецидивов.

Балацкая Н.В., Будзинская М.В., Щеголева И.В., Гурова И.В., Кузмин С.Г., Ворожцов Г.Н.

ВЛИЯНИЕ ИЛ-8 НА РЕЗУЛЬТАТЫ КОМБИНИРОВАННОЙ ФДТ И АНТИАНГИОГЕННОЙ ТЕРАПИИ СУБРЕТИНАЛЬНОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ НИИ глазных болезней РАМН, Москва ГУП МНКЦ «Интермедбиофизхим», Москва

Субретинальная неоваскулярная мембрана (СНМ) является нередким осложнением заболеваний глазного дна и ведет к значительному, и стойкому снижению остроты зрения. Этапы формирования СНМ – звенья сложного процесса, приводящего к инвалидизации пациента. На основании литературных данных известно, что процесс СНМ в своем развитии проходит несколько стадий: «воспаления», активной клеточной пролиферации, медленного рубцевания – имеющих свою клиническую и морфологическую картину с преобладанием определенного спектра цитокинов. В то же время степень «активности» СНМ (ангиогенез /рубцевание) также напрямую зависит от взаимодействия цитокинов и факторов роста. В настоящее время известно, что дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов может отразиться непосредственно на результатах лечения. ИЛ-8 – один из основных провоспалительных хемокинов, образуемый макрофагами, эпителиальными и эндотелиальными клетками. ИЛ-8 – сильный хемоаттрактант для нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов, эозинофилов, усиливает адгезивные свойства нейтрофилов, изменяя экспрессию интегринов и других соединений с адгезивными свойствами. Свойства ИЛ-8 вызывать миграцию клеток и способствовать их адгезии определяют его как активного участника острой воспалительной реакции. Необходимо детальное изучение влияния ИЛ-8 на результаты комбинированной фотодинамической и антиангиогенной терапии.

Материал и методы. Под наблюдением находилось 34 человека с преимущественно классической формой СНМ, развившейся на фоне возрастной макулярной дегенерации и осложненной миопии. Оценка эффективности лечения базировалась на данных визометрии, томографии центральной зоны сетчатки и флюоресцентной ангиографии глазного дна (ФАГД), которую проводили стандартным методом на фундус-камере FF 450 plus «Карл Цейс» (Германия). Оптическую когерентную томографию (ОКТ) проводили на томографе Stratus Stratus «Карл Цейс» (Германия).

В качестве ФС при проведении ФДТ применяли отечественный препарат «Фотосенс» 0,2 %-ный раствор для инъекций (Solutio “Photosensis” 0,2% pro injectionibus) производства ФГУП «ГНЦ НИОПИК», разрешенный для медицинского применения при проведении ФДТ и ФД злокачественных онкологических заболеваний. Регистрационное удостоверение Р №000199/02 – 2001 от 25.07.2001.

Препарат вводили внутривенно в дозе 0,05 мг/кг. Условия облучения: сеанс проводили с использованием лазера λ 675 нм, экспозиционной световой дозой 120 Дж/см². Количество сеансов колебалось от 3 до 5 в неделю в зависимости от клинической картины СНМ.

Суммарная световая доза не превышала 500 Дж/см². Авастин вводили эндовитреально в дозе 1,25 мг (0,05 мл) на 3 сутки после проведения ФДТ.

Материалом для лабораторных исследований послужили сыворотка периферической крови обследуемых пациентов. Кровь забирали с 8 до 9 часов утра натошак из локтевой вены с помощью стандартных вакуумных систем «BD VACUTAINER™» в пробирки для сбора сыворотки крови без активатора свертывания.

Концентрацию ИЛ-8 определяли с помощью ИФА диагностическими тест-системами Bender MedSystems® (Австрия) на спектрофотометре «Stat-Fax -2100» (США). Статистический анализ проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel, SPSS.

Результаты. Анализ ангиографической картины в группе комбинированной ФДТ и анти-VEGF терапии показал запустевание сети хориоидальной неоваскуляризации (более чем 50% от общей площади), отсутствие флуоресценции зоны СНМ в хориоидальную и раннюю артериальную фазы у 30 пациентов (30 глаз) в сроки до 1 мес. Вслед за снижением активности мембраны происходили резорбция перифокального отека сетчатки и геморрагий, что напрямую коррелировало с улучшением остроты зрения у пациентов с небольшой площадью поражения. Эффект сохранялся на протяжении 3 месяцев наблюдения. Впоследствии всем пациентам были проведены повторные курсы лечения (от 1 до 4). В 4 случаях активность СНМ сохранялась. Через 6 мес. наблюдения (несмотря на проводимое лечение) у 3 пациентов было отмечено нарастание интратретинального отека с единичными петехиальными перифокальными геморрагиями у нижнего края СНМ, формирование в макулярной зоне микрокист сетчатки. При проведении необходимых повторных процедур положительный эффект был стойким в течение 12 месяцев наблюдения у 28 пациентов из 34.

Клинические наблюдения показали, что особую трудность в лечении составляют СНМ, сопровождающиеся обширными, массивными кровоизлияниями и экссудацией. В некоторых случаях после проведения ФДТ экссудация нарастала. У пациентов с ответной экссудативной реакцией уровень ИЛ-8 в плазме достоверно ($p \leq 0,000$) превышал показатели у аналогичных больных без реактивного ответа на лазерное воздействие ($34,09 \pm 23,11$ против $9,693 \pm 3,498$ пкг/мл). В 4 случаях, при превышении ИЛ-8 более 30,0 пкг/мл для купирования диффузного отека сетчатки использовались местные введения противовоспалительных препаратов.

Заключение. Повышенное содержание ИЛ-8 в плазме у пациентов с субретинальной неоваскулярной мембраной может являться фактором риска развития диффузного отека сетчатки в ответ на проведение комбинированной ФДТ и антиангиогенной терапии.

Ю.А. Белый, А.В. Терещенко, П.Л. Володин, Н.Н. Юдина, М.А. Плахотный, Д.К. Соловьев,
Филиал ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза»

им. академика С.Н. Федорова», Калуга I. ФДТ С ДРОБНЫМ ВВЕДЕНИЕМ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА В ЛЕЧЕНИИ ХОРИОИДАЛЬНЫХ МЕЛАНОМ

Цель – оценка клинической эффективности ФДТ с дробным введением фотосенсибилизатора в лечении хориоидальной меланомы.

Материалы и методы. Под наблюдением находились 3 пациента (3 глаза) с МХ больших разме-

ров пре- и экваториальной локализации. По данным В-сканирования размеры основания составляли до 12,0 на 9,5 мм, высота проминенции – до 8,0 мм. По данным цветового и энергетического доплеровского картирования (ЦДК и ЭДК) тип кровоснабжения опухоли во всех случаях соответствовал гиперваскулярному. Острота зрения при поступлении составляла в 2 случаях 0,01 и в 1 – 0,02 с неправильной светопроекцией.

Всем пациентам проводили транспупиллярную ФДТ с хлориновым ФС – бис-N-метилглюкаминная соль хлорина е6. В ходе ФДТ ФС вводили дробно: 70% дозы капельно 10 мин., через 1,5 ч – оставшиеся 30% болюсно. В зависимости от регрессии опухоли проводили повторные сеансы ФДТ (в 1 случае 2 сеанса, в 2 по 3). Срок наблюдения – 12 мес.

Результаты. Через год после ФДТ во всех случаях на месте новообразования определялся плоский хориоретинальный рубец с грубой неравномерной пигментацией, ограниченный по площади зоной прежнего расположения меланомы. По данным УЗИ в режиме ЭДК и ЦДК в течение периода наблюдения отмечалось постепенное обеднение сосудистого русла опухоли вплоть до полного его исчезновения. Признаков продолженного роста, рецидива и метастазирования выявлено не было.

Заключение. Многоэтапная ФДТ с дробным введением ФС позволяет достичь полной регрессии меланомы хориоидеи при отсутствии рецидивов и метастазирования в срок наблюдения 12 мес.

II. СОЧЕТАНИЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ ДЕСТРУКЦИИ И ФДТ В ЛЕЧЕНИИ ХОРИОИДАЛЬНЫХ МЕЛАНОМ

Цель – оценка эффективности сочетанного воздействия электрохимической деструкции и ФДТ в лечении хориоидальных меланом больших размеров.

Материалы и методы. Под наблюдением находились 2 пациента (2 глаза) с МХ больших размеров экваториальной локализации.

По данным В-сканирования размеры основания составляли до 11,0 на 13,0 мм, высота проминенции – до 6,0 мм. По данным цветового и энергетического доплеровского картирования (ЦДК и ЭДК) тип кровоснабжения опухоли во всех случаях соответствовал гиперваскулярному.

Для проведения ФДТ использовали хлориновый ФС – бис-N-метилглюкаминную соль хлорина е6, который вводили внутривенно в дозе 0,8 мг/кг, причем половину дозы за 1,5 часа, половину – за 10 минут до ЭХЛ.

Трансклерально выполняли ЭХЛ опухоли с зарядом 20 Кл в течение 10 минут, затем проводили трансклеральное лазерное облучение основания опухоли с длиной волны, соответствующей пику поглощения ФС светового излучения ($\lambda = 662$ нм). Срок наблюдения – до 12 мес.

Результаты. При контрольном исследовании через 6 мес. в обоих случаях офтальмоскопически на месте новообразования определялся плоский с неоднородной пигментацией хориоретинальный очаг с остаточной проминенцией до 1,0 мм. При ультразвуковом исследовании в режиме ЭДК и ЦДК внутриопухолевой кровотоков в проекции очага полностью отсутствовал. В течение срока наблюдения рецидивов и метастазов не обнаружено.

Заключение. Сочетанное воздействие электрохимической деструкции и ФДТ способствует полной регрессии меланомы хориоидеи при отсутствии рецидивов и метастазирования в течение 12 мес.

Волгин В.Н.¹, Странадко Е.Ф.², Садовская М.В.¹,
Колбина М.С.³, Тришкина О.В.³, Ламоткин И.А.¹

¹ГВКГ им. акад. Н.Н. Бурденко, Москва

²ГНИ лазерной медицины МЗ И СР РФ, Москва

³Кафедра дерматологии ГИУВ МО РФ, Москва

Все больше расширяется спектр применения ФДТ при различных заболеваниях.

I. ФДТ НОВООБРАЗОВАНИЙ КОЖИ И СЛИЗИСТЫХ С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОМ ФОТОДИТАЗИНОМ

Цель исследования. Разработка оптимальных режимов ФДТ с фотосенсибилизатором Фотодитазин при различной патологии кожи и слизистых.

Материалы и методы. В ГВКГ им. Н.Н. Бурденко совместно с ГНИ лазерной медицины МЗ И СР РФ лечение ФДТ с фотодитазин проведено 197 больным с базально-клеточным раком кожи (БКРК) в возрасте от 20 до 93 лет (в среднем 63,4 года), в т.ч. 144 (73,1%) мужчины, 53 (26,9%) женщины. Также проведено лечение больных с плоскоклеточным раком кожи (4), метатипическим раком кожи (1), болезнью Кейра (4), эрозией шейки матки (5), лейкоплакией (12), кератоакантомой (1), лимфомой кожи (1), псориазом (3), трофическими язвами кожи (3), келоидными рубцами (2), хейлитом (3). Использовали лазерные установки Аткус-2, Кера-лаз, Кристалл. Выходная мощность лазеров составляла 0,1–3,0 Вт. Плотность мощности излучения 0,1–1,5 Вт/см². Фотодитазин вводили внутривенно из расчета 0,7–1,0 мг/кг. Оценка результатов ФДТ проводилась по следующим критериям: полная резорбция (ПР) опухоли – отсутствие признаков опухолевого роста; частичная резорбция (ЧР) – уменьшение размеров опухоли не менее чем на 50%; без эффекта (БЭ) – уменьшение размера опухоли менее чем на 50%.

Результаты. При БКРК ПР опухолей наступила у 180 (91,4%) больных, частичная – у 17 (8,6%). В процессе лечения отработана доза световой энергии при использовании Фотодитазина. Оценена эффективность доз световой энергии от 50 до 500 Дж/см². Наиболее оптимальной дозой для поверхностных очагов оказалась 100–200 Дж/см², солидных образований – 200–300 Дж/см², а язвенных и экзофитных форм опухолей с глубоким инфильтративным ростом – 300–500 Дж/см². При лечении ПКРК ПР наступила в 75% случаев. При лечении МТРК, болезни Кейра, лейкоплакии, эрозий шейки матки, кератоакантомы ПР наступила во всех случаях. При лечении другой патологии кожи и слизистых достигнуто значительное улучшение.

Вывод. ФДТ можно использовать с высоким терапевтическим эффектом при заболеваниях кожи и слизистых различной этиологии.

II. ПРИМЕНЕНИЕ АППЛИКАЦИОННОЙ ФОРМЫ ФОТОДИТАЗИНА ПРИ ФДТ БОЛЬНОГО С МНОЖЕСТВЕННЫМИ БАЗАЛИОМАМИ

Проблема лечения базалиом является актуальной для населения страны в целом. Это обусловлено уровнем заболеваемости, рецидивирующим характером течения, частой локализацией на открытых участках кожного покрова, особенно на лице, недостаточной эффективностью существующих методов терапии, значимыми косметическими дефектами.

Цель исследования: оценка результатов лечения множественных поверхностных базалиом методом ФДТ с применением аппликационной формы фотодитазина.

Материалы и методы: Больному М. с множественными базалиомами проведена ФДТ с использованием аппликационной формы Фотодитазина за 1 сеанс. Облучение опухолей проводилось на лазере «Аткус-2». Фотодитазин наносился на опухолевые очаги из расчета 2 мкл/см² с экспозицией 20–60 мин.

Обсуждение и выводы: У больного М. при поступлении в КВО госпиталя было 14 базалиом (5 солидных и 9 поверхностных) и 10 кератом. Высота 3 солидных базалиом до 1 мм, двух – 2 мм.

ФДТ проводилась на все очаги с использованием дозы световой энергии 200 Дж/см². В результате лечения произошло полное разрешение 8 поверхностных базалиом и 3 солидных, а оставшиеся в 2–3 раза уменьшились в размерах. Высота двух рецидивных солидных базалиом по 2 мм. После лечения все кератомы разрушились полностью. Через 2 мес. остаточные опухоли были удалены методом электрокоагуляции. Оценка результатов проводилась в течение 1 года. Рецидивов не было.

Использование ФДТ эффективно при лечении множественных поверхностных базалиом и солидных до 1 мм высотой, что позволяет повысить эффективность лечения, добиться хороших косметических результатов, сократить сроки лечения.

Л.В. Дубасова¹, А.А. Брилкина^{2, 3}, Е.А. Павлова²,
И.В. Балалаева^{2, 3}, А.Г. Орлова³, Е.А. Сергеева^{2, 3},
А.Р. Катичев^{2, 3}, Н.М. Шахова³

ИССЛЕДОВАНИЕ НАКОПЛЕНИЯ И ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В КУЛЬТУРАХ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

¹НГУ ИМ. Р.Е. Алексеева, Н. Новгород

²НГУ ИМ. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород

³ИПФ РАН, Н. Новгород, Н. Новгород

Задачи исследования. ФДТ является перспективным современным методом лечения опухолей с помощью фотосенсибилизирующих соединений (ФС). При разработке эффективных фотоактивных препаратов важны особенности взаимодействия ФС с клетками, места их субклеточной локализации и динамика накопления. Наиболее перспективны те фотодинамические препараты, которые местом своего накопления имеют область ядра или митохондрии, что в результате способствует реализации противоопухолевого эффекта через механизм апоптоза. Целью нашей работы являлся сравнительный анализ накопления и распределения трех типов ФС в различных линиях клеточных культур человека.

Материалы и методы. В работе использовали препараты «Фотодитазин», «Фотосенс» и «Аласенс». Динамику накопления препаратов в клеточных культурах исследовали с помощью проточного цитофлуориметра FACScalibur (Becton Dickinson, USA). Визуализацию внутриклеточного распределения ФС в митохондриях, лизосомах, аппарате Гольджи и ЭПР осуществляли с использованием системы лазерной сканирующей микроскопии LSM 510 META (Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany).

Результаты. Было установлено, что экзогенно вводимые ФС («Фотодитазин», «Фотосенс») имеют одинаковую динамику накопления, но различную внутриклеточную локализацию. Выявлено, что для препарата «Фотосенс» характерна кумуляция в лизосомах.

Препарат «Фотодитазин» накапливался преимущественно в митохондриях и в околоядерной области, преимущественно в аппарате Гольджи. На нормальных и раковых клетках печени была показана разница накопления эндогенно синтезируемого аласенс-индуцированного протопорфирина IX, он в большей степени выявлялся в опухолевых клетках и визуализировался в митохондриях и приядерной ЭПР.

Выводы. В результате выполненной работы нами были установлены отличия в динамике накопления экзо- и эндогенных ФС в нормальных и опухолевых клетках человека. Также, в зависимости от химической природы исследуемых препаратов существенно различалась их внутриклеточная локализация.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 08-02-99049) и программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине»

Дуванский В. А.

ФДТ С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОМ ХЛОРИНОВОГО РЯДА «ФОТОДИТАЗИН» В ЭНДОСКОПИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ С ДУОДЕНАЛЬНЫМИ ЯЗВАМИ
ФГУ «ГНЦ лазерной медицины ФМБА», Москва

Цель. Оценить эффективность комплексного лечения больных с дуоденальными язвами с применением эндоскопической ФДТ. Проведен анализ результатов обследования и лечения 101 пациента с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки. В зависимости от проводимого лечения все больные были разделены на две группы: основную и контрольную. В основную группу вошли 50 больных с язвами двенадцатиперстной кишки, которым на фоне стандартной противоязвенной терапии, проводили эндоскопическую ФДТ, для проведения которой применяли фотосенсибилизатор Фотодитазин. В качестве источника лазерного излучения мы использовали медицинскую лазерную установку «Аткус-2». Выходная мощность излучения 2 Вт, λ 661нм, доза излучения 6 Дж/см². Контрольную группу составил 51 пациент с язвами двенадцатиперстной кишки (получали консервативное противоязвенное лечение по традиционной схеме).

Средний возраст больных составил 42,8±1,8 года. Всем выполняли ЭГДС и биопсию для проведения морфологического, иммуногистохимического исследования и для уреазного теста с целью определения степени обсемененности желудка *Helicobacter pylori* и оценки динамики репаративных процессов. Оценку микроциркуляции слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки проводили методом лазерной доплеровской флоуметрии с использованием аппарата ЛАКК-01.

Результаты проведенных исследований показали, что применение ФДТ способствует сокращению сроков заживления язвенного дефекта в 1,43 раза по сравнению с результатами контрольной группы. После лечения *Helicobacter pylori* не был выявлен при контрольном исследовании у 84,2% пациентов контрольной группы и 82% основной, что сопоставимо и соответствует рекомендациям Российской ассоциации гастроэнтерологов. Отмечено снижение числа рецидивов у больных основной группы в 1,67 раза. Результаты морфологических исследований свидетельствовали, что комплексное лечение дуоденальных язв, оказывает стимулирующее действие на процессы нормализации регионарной микроциркуляции и репаративной регенерации. ФДТ способствует активации фагоцитарной активности, с увеличением количества макрофагов в зоне язвенного де-

фекта и раннему уменьшению лимфоплазмочитарной инфильтрации слизистой оболочки. Исследования микроциркуляции показали, что применение разработанной методики в лечении больных с дуоденальными язвами активизирует транскапиллярный обмен в области язвенного дефекта, способствует восстановлению структуры и функции микроциркуляторного русла пораженной области, что приводит к сокращению сроков восстановления регионарной микроциркуляции.

Применение эндоскопической ФДТ в комплексном лечении дуоденальных язв способствует нормализации регионарной микроциркуляции в слизистой оболочке желудка и двенадцатиперстной кишки, стимуляции репаративных процессов, сокращению сроков заживления язвенного дефекта и уменьшению частоты развития рецидивов дуоденальных язв.

К.В. Ермакова¹, З.С. Смирнова¹, И.Ю. Кубасова¹, Л.М. Борисова¹, М.П. Киселева¹, Н.А. Оборотова¹, И.Г. Меерович¹, Г.А. Меерович³, Е.А. Лукьянец², Г.Н. Ворожцов²

ФДТ ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ЛЕЧЕНИИ ГЛИОБЛАСТОМЫ 101/8 КРЫС

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

²ФГУП «ГНЦ»НИОПИК», Москва

³ЦЕНИ ИОФ им. А.М. Прохорова РАН, Москва

Лечение злокачественных глиом головного мозга составляет одну из нерешенных задач в нейроонкологии. На современном этапе наиболее эффективным является комбинированный подход к лечению злокачественных глиом, включающий хирургическое удаление опухоли, лучевую и химиотерапию, а также ряд новых методов лечения: иммунотерапию, антиангиогенную терапию, ФДТ.

Оперативное вмешательство является методом выбора при лечении больных с глиомами и главной целью его является удаление максимального объема опухоли, а также постановка точного гистологического диагноза.

Химиотерапевтическое лечение в сочетании с предоперативным удалением опухоли и послеоперационной лучевой терапией позволяет повысить одно- и двухлетнюю выживаемость больных со злокачественными глиомами. Несмотря на усовершенствование методов лечения, прогноз для больных с глиомой остается неблагоприятным.

ФДТ является принципиально новым методом в лечении злокачественных опухолей головного мозга, применяемого при комбинированной терапии.

Метод выгодно отличается от традиционной терапии отсутствием тяжелых местных и системных осложнений.

Цель. Оценка эффективности ФДТ с использованием отечественного фотосенсибилизатора Тиосенс при комбинированном лечении глиобластомы 101/8 крыс.

Материалы и методы. Глиобластоме 101/8 (1–2 млн. опухолевых клеток) подсаживали троакаром через трепанационное отверстие на глубину 3–4 мм в дно правого бокового желудочка мозга. Липосомальную дисперсию Тиосенса в дозе 3 мг/кг вводили в/в через 6 дней после перевивки опухоли и за 24 ч до проведения ФДТ. Уровень накопления Тиосенса оценивали спектрально-флуоресцентным методом. Лазерное облучение проводили поверхностно и интестинциально в дозах 90 Дж/см² и 54 Дж/см, соответственно. Темодал вводили *per os* дважды с интервалом 48 ч в суммарной дозе 50 мг/кг. Критерием эффективности служило УПЖ, %.

Результаты. При изучении динамики уровня накопления Тиосенса в ткани опухоли в процессе ее роста установлено, что уровень накопления липосомальной дисперсии Тиосенса в глиобластоме 101/8 через 24 часа после в/в введения уже на 6 день опыта составлял 1,8 усл. ед., такой же уровень наблюдался и на 9–10 дни опыта.

В нормальной ткани головного мозга крыс интенсивность флуоресценции (уровень накопления) оставалась на протяжении всего опыта в пределах 0,1 усл. ед. При оценке селективности накопления дисперсии Тиосенса в опухолевой ткани показано, что индекс селективности с 6 по 9 день опыта составлял 15, а к 10 дню он возрастал до 18.

На 9 день опыта через 24 часа после введения дисперсии Тиосенса в дозе 3 мг/кг уровень накопления в ткани глиобластомы 101/8 был в 2,6 раза выше, чем через 6 часов после введения препарата и составлял 1,73 усл. ед. В то же время в нормальной ткани головного мозга уровень накопления дисперсии Тиосенса, наоборот, через 24 ч после введения препарата был в 2 раза ниже, чем через 6 ч. Эти данные свидетельствуют, что лечение глиобластомы 101/8 можно начинать уже на 6 день после перевивки опухоли, а лазерное облучение следует проводить через 24 часа после введения дисперсии Тиосенса. При оценке эффективности ФДТ с дисперсией Тиосенса через трепанационное отверстие на глиобластоме 101/8 показано, что УПЖ составляет 22%.

Эффективность комбинированного лечения глиобластомы 101/8 крыс, включающего ФДТ с липосомальной дисперсией Тиосенса и декомпрессионную краниотомию размером 4×5 мм, при поверхностном облучении составила 48% УПЖ, а при лазерном облучении, проведенном интерстициально – 70% УПЖ.

При проведении комбинированной терапии с использованием ФДТ с Тиосенсом и последующей химиотерапией с Темодалом установлено, что 50% крыс с глиобластомой 101/8 были излечены, а у оставшихся 50% крыс УПЖ достигает 127%. В то же время эффективность Темодала в монотерапии оказалась значительно ниже – препарат не вызывал излечение крыс с глиобластомой 101/8, а УПЖ составляло 54% против 127% при комбинированном лечении.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о повышении эффективности комбинированного лечения глиомы 101/8 крыс при использовании ФДТ с Тиосенсом.

Л.Г. Клатшина¹, Е.Ю. Ладиллина¹, И.С. Григорьев¹, М.В. Ширманова², И.В. Балалаева³, С.А. Мысягин³, Е.В. Загайнова²

БИОСОВМЕСТИМЫЕ СВЕТОИЗЛУЧАЮЩИЕ НАНОЧАСТИЦЫ, ДОПИРОВАННЫЕ ПОРФИРАЗИНОВЫМ КОМПЛЕКСОМ Yt_3 ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ

¹ИМХ им. Г.А. Разуваева РАН, Н. Новгород

²ГОУ ВПО НГМА, Н. Новгород

³ГОУ ВПО НГУ им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород

Известно, что тетрапиррольные макроциклы и их металлокомплексы перспективны для использования в качестве фотосенсибилизаторов во флуоресцентной диагностике и ФДТ онкологических заболеваний. Нами получены биосовместимые светоизлучающие водные наносuspensions, содержащие новый тетрацианотетрафенилпорфиразиновый комплекс иттербия, обладающий люминесценцией в диапазоне оптической прозрачности биотканей (650–1000 нм). Указан-

ный комплекс содержится в наносuspensions в составе гибридных монодисперсных наночастиц дискообразной формы величиной 15–20 нм.

Показана высокая стабильность комплекса в водных растворах и обнаружено необычно резкое возрастание интенсивности эмиссии наночастиц в биологических средах (сыворотка крови, водный раствор альбумина), указывающее на их сильную склонность к образованию прочных конъюгатов с белками.

Экспериментально на мышках с перевивкой опухолью РШМ-5 продемонстрирована возможность применения порфиразинового комплекса иттербия, входящего в состав биосовместимых гибридных наночастиц, в качестве флуоресцентного маркера злокачественных новообразований. Методом диффузионной флуоресцентной томографии (ДФТ) зарегистрировано повышение интенсивности сигнала в опухоли уже через 15 мин после внутривенного введения суспензии, что свидетельствует о накоплении порфиразинового комплекса в ткани. В период с 3 до 6 часов уровень сигнала был максимален, превышая контрольное значение (до инъекции) в 3 раза. Слабая флуоресценция в опухоли сохранялась более 6 суток. Исследование образцов опухолевой ткани *ex vivo* методами флуоресцентной спектроскопии и конфокальной флуоресцентной микроскопии подтвердило результаты ДФТ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 09-02-97065 и 10-03-90006-Бел_а), а также Федерального агентства по науке и инновациям (ГК № 02.740.11.0086).

Миславский О.В.¹, Алексеев Ю.В.¹, Пономарев Г.В.², Муравьев М.В.¹

ИССЛЕДОВАНИЕ ФД ДЕЙСТВИЯ ДИМЕГИНА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ВВЕДЕНИЯ В КОЖУ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ЖИВОТНЫМ ¹ФГУ «ГНЦ лазерной медицины Росздрава», Москва ²ИБХ РАН, Москва

Цель. Исследование фотодинамического действия 0,1 %-ного раствора димегина (производного дейтеропопоририна–IX) на кожу экспериментальных животных при различных способах введения:

- 1) подкожно;
- 2) внутрикожно;
- 3) наочно.

Материалы и методы. Эксперимент проводили на 45 белых морских свинках-самцах массой 450–500 г, которых соответственно разделили на три группы по 15 животных на каждый способ введения.

В свою очередь каждая группа делилась на три подгруппы:

- а) введение раствора димегина с облучением;
- б) введение раствора димегина без облучения, затем участок кожи каждого животного в этой подгруппе находился на открытом свете;
- в) введение раствора димегина без облучения, после чего участок кожи закрывался от света пластырем. Размер подготовленных участков кожи составлял 4 см².

Облучение в подгруппах а) всех трех групп животных проводили аппаратом фототерапевтическим “Солярис” (АФС) средней мощностью 475 мВт при λ 390–410 нм (соответствует полосе Соре). Поглощенная плотность мощности излучения в эксперименте составила 34,6 Дж/см².

Результаты. В подгруппе а) экспериментальной группы №1 (п/к введение 0,2 мл р-ра димегина) после облучения отмечались выраженный отек и воспаление через 4 ч и на 1 сутки после облучения.

На 2 сутки наблюдалось формирование струпа, при наличии отека и воспаления. На 4 сутки в подгруппе а) группы №1 отмечалось уменьшение отека и воспаления, на 8 сутки на коже животных остался струп без отека и воспаления. При внутрикожном введении 0,1 мл раствора димегила (подгруппа а) группы №2 размеры и интенсивность воспаления и отека были меньше, чем при подкожном введении, а динамика в формировании струпа, развитие отека и воспаления с последующим их уменьшением соответствовали тем же срокам. При накожном нанесении 0,3 мл раствора димегила и облучении в группе №3 отмечалось покраснение на коже без отека, которое исчезало на следующие сутки. В подгруппе б) группы №1 (подкожное введение без облучения на открытом свете) у животных отмечалось воспалительная реакция и отек на 1 сутки, которые были значительно меньше чем в подгруппе а) при облучении. Формирование струпа в подгруппе б) группы №1 также наблюдалось на 2 сутки. На 4 сутки отмечалось уменьшение воспаления и отека кожи у животных, на 8 – отсутствие воспалительной реакции. При внутрикожном введении без облучения на открытом свете у отдельных животных на 1 сутки была реакция на коже в виде покраснения, которая исчезала на 2 сутки. При подкожном введении и внутрикожном введении без облучения на участках кожи закрытых от света воспаления и отека не было выявлено. Простое накожное нанесение раствора димегила без облучения в подгруппах б) и в) группы №3 также не вызывало воспалительных реакций.

Заключение. Таким образом, установлено, что исследованный препарат обладает выраженным фотодинамическим эффектом при использовании источника излучения в синем диапазоне (полоса Соре). Выраженность эффекта зависит от способа введения препарата. Данное химическое соединение, надо отметить, экономически выгодно в получении и последующей наработке, что делает его весьма перспективным для использования в медицинской практике.

Е. К. Словоходов, В.И. Полсачев,

А. Я. Самохин, П.В. Ткачев

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕЛЯ «ФОТОДИТАЗИН» В ЛЕЧЕНИИ

БАЗАЛЬНОКЛЕТОЧНОГО РАКА КОЖИ

НИМСИ МГМСУ, ГКБ № 40, Москва

Онкологические заболевания являются одной из значимых проблем медицины. В последние годы отмечается рост заболеваемости базальноклеточным раком кожи. В связи с частыми рецидивами БКРК, и зачастую, неудовлетворительными косметическими результатами лечения традиционными способами актуальным является изучение альтернативных методов лечения данной категории больных.

Задача. Изучение возможности применения геля «Фотодитазин» в лечении базальноклеточного рака кожи в условиях дневного стационара.

Материалы и методы. Проведено лечение 123 (100%) пациентов БКРК. Всего пролечено 186 опухолевых узлов. Размер опухоли варьировал от 0,2 см до 2,1 см (в среднем 0,84 см). Мужчин 60 (48,8 %), Женщин 63 (51,2 %). 1 опухоль имелась у 92 пациентов (74,8 %), 2 – у 13 (10,6 %), 3 – у 10 (8,1 %), 4 – у 4 (3,3 %), 5 – у 2, и 6 – у 2 пациентов (по 1,6 % соответственно). На голове опухолевые узлы располагались у 74 пациентов (60,2 %), на туловище у 44 (35,8 %), на голове и туловище в 5 случаях (4 %). В возрасте от 60 до 80 лет пролечено 39 пациентов (31,7 %), от 80 и старше 84 пациента (68,3 %). Гель «Фотодитазин» при-

менялся из расчета 1 мл геля на 5 см² опухоли. Возбуждение фотодинамической реакции проводилось лазерным излучением длиной волны 662±3 нм.

Плотность мощности 300 мВт/см²; плотность энергии 300 Дж/см².

Результаты. В процессе проведенного лечения полной регрессии опухолей удалось достичь у 109 пациентов (88,6 %), частичной регрессии у 14 (11,4 %). При проведении повторных сеансов ФДТ достигнута полная регрессия всех опухолей. Прогрессирования роста БКРК после проведения ФДТ не отмечалось. В процессе проведения сеансов ФДТ обезболивание не требовалось. Слабо и умеренно выраженный болевой синдром регрессировал сразу после прекращения воздействия лазерным излучением. В сроки наблюдения до 9 мес. диагностирован 1 случай рецидива опухоли (0,8 %).

Выводы. ФДТ базальноклеточного рака кожи с применением геля «Фотодитазин» является эффективным методом лечения. Данная методика применима амбулаторно, что не требует длительного обследования и госпитализации в стационар. Отсутствуют ограничение светового режима и необходимость защиты открытых участков тела применением доргостоящих мазей и эмульсий.

Е.Ф. Странадоко¹, В.Н. Волгин¹, М.В. Рябов¹,

А.И. Лобаков², В.А. Морохотов², Т.М. Ибрагимов¹

¹ФГУ «ГНЦ Лазерной медицины ФМБА», Москва

²МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского

I. ВЫБОР ДОЗЫ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА И ОПТИМАЛЬНЫХ РЕЖИМОВ СВЕТОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФДТ И УСТРАНЕНИЯ ПОБОЧНЫХ ЭФФЕКТОВ

Задача. Определение оптимальных параметров ФДТ злокачественных новообразований.

Материалы и методы. Начиная с первых этапов клинического применения ФДТ в России в 1992 г. в ГНЦ Лазерной медицины, мы проводили оптимизацию доз используемых фотосенсибилизаторов и других параметров ФДТ. Наиболее выразительные результаты получены нами при работе с препаратом Фоскан (BioLitec-pharma, Германия). Исследование с Фосканом проводится нами с 2002 г. в группе из 220 больных БКРК, имевших 850 опухолевых очагов, включая 38% рецидивных опухолей, 53% множественных и 26% солидных опухолей толщиной более 3 мм.

В качестве источника света использовали диодные лазеры с λ 652 нм и выходной мощностью 1,0 и 3,0 Вт (Biolitec AG, Jena, Germany) и световоды с микролинзой на конце, обеспечивающие гомогенное распределение света в пятне.

Результаты. Общая частота полных резорбций БКРК составила 96,7% при хороших косметических результатах. Оптимальным протоколом ФДТ с Фосканом был следующий: доза фоскана 0,05 мг/кг, доза света – 50 Дж/см² при ЛСИ 48 ч. В этой наибольшей группе частота полных резорбций составила 100%. Изучение отдаленных результатов показало, что ФДТ рака кожи с минимизированными дозами Фоскана по оптимизированным протоколам ведет к высокой частоте излечения от БКРК и длительному безрецидивному периоду. Нами выявлено, что частота развития рецидивов БКРК после лечения методом ФДТ с Фосканом ниже, чем при применении традиционных методов лечения. Динамическое наблюдение за больными в сроки 6–72 мес. позволило выявить частоту рецидивирования БКРК 6,25% при 3-летней прослеженности 65%.

Выявление большей части рецидивов приходится на срок до 2 лет после ФДТ. Только 2 рецидива выявлены в интервале 24–36 мес. Случаев развития рецидивов через 3 и более лет после ФДТ не отмечено.

Заключение. ФДТ с Фосканом – эффективный метод лечения первичного распространенного и рецидивного БКРК с минимумом побочных реакций и осложнений.

Оптимизация клинических протоколов ФДТ с дозой Фоскана 0,05 мг/кг обеспечивает высокую частоту ПР опухолей, длительный безрецидивный период и незначительную частоту рецидивов.

II. МЕТОДЫ ПОДВЕДЕНИЯ СВЕТА ПРИ ФДТ РАКА БДС И ВНЕПЕЧЕНОЧНЫХ ЖЕЛЧНЫХ ПРОТОКОВ

Задача. Разработка методов подведения света при ФДТ рака БДС и внепеченочных желчных протоков.

Материалы и методы. К настоящему времени мы имеем опыт лечения методом ФДТ 21 большого рака БДС и внепеченочных желчных протоков (ВЖП). Фотосенсибилизаторы (фотосенс, хлориновые производные) вводили внутривенно. В зависимости от локализации опухоли, ее распространенности и предшествующих лечебных процедур использовали несколько путей подведения света:

1. Эндоскопическое поверхностное облучение опухоли БДС со стороны 12-перстной кишки с использованием световода, введенного через биопсийный канал эндоскопа.
2. Эндоскопическое внутрипросветное облучение терминального отдела ОЖП по световоду с цилиндрическим диффузором длиной 10–20 мм, введенному через проток БДС или папиллосфинктеротомическое отверстие – 10 больных.
3. Парастентальное облучение опухоли по световоду с цилиндрическим диффузором, введенному рядом с ранее установленным стентом, при блоке в области БДС и терминального отдела ОЖП – 3 раза.
4. Внутрипросветное облучение стенозированного опухолью ОЖП, пузырного и печеночного протоков с использованием световодов с цилиндрическим диффузором длиной 20–50 мм, вводимых через катетер после чрезкожного чрезпеченочного дренирования или через дренаж после паллиативных операций.
5. Комбинированный метод подведения света.

Результаты. 21 больному проведено 34 курса ФДТ. 22 курса ФДТ проведено повторно в связи с наличием остаточной опухоли или в соответствии с протоколом для предупреждения продолженного роста опухоли в различные сроки после первого курса ФДТ (от 2 мес. до 2 лет).

Исходя из особенностей локализации опухоли и распространенности процесса, нам довольно часто пришлось пользоваться комбинированным методом подведения света.

Продолжительность жизни колеблется от 14 до 60 мес. Средняя продолжительность жизни 2,5 года.

Заключение. Представленные варианты подведения света позволяют эффективно воздействовать методом ФДТ на злокачественные опухоли таких труднодоступных локализаций, как БДС, пузырный, печеночный и общий желчный проток, при различных осложненных ситуациях.

III. ВЕДУЩАЯ РОЛЬ ХЛОРИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ И ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ ЛАЗЕРОВ В ФДТ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ НАЧАЛА XXI ВЕКА

Задачи исследования. Провести сравнительную оценку применяемых в клинике фотосенсибилизаторов и определить наиболее эффективные, безопасные и удобные в практическом применении для ФДТ злокачественных новообразований.

Материалы и методы. В ГНЦ лазерной медицины с 1992 г. накоплен большой опыт применения ФДТ злокачественных опухолей различных локализаций с фотосенсибилизаторами 4 групп: производных гематопорфирина (фотогем), сульфированного фталоцианана алюминия (фотосенс), 5-аминолевулиновой кислоты (аласенс) и группы хлориновых производных. Базируясь на предшествующем опыте, начиная с 1998 г., для ФДТ злокачественных новообразований мы используем в основном хлориновые производные: фотодитизин, фотохлорин, радахлорин, фотолон и фоскан. В качестве источников света для ФДТ с хлориновыми производными использовали полупроводниковые лазеры: диодный лазер «Милон» (производитель – ООО «Сигм-Плюс и Милон», С-Петербург, Москва, Россия), генерирующий свет $\lambda = 662$ нм, диодный лазер ЛФТ 630-675 (ЗАО «Биоспек», Москва, Россия), генерирующий свет $\lambda = 662$ нм для хлориновых производных, и диодный лазер «Кералаз» (производитель Biolitec AG, Jena, Germany), генерирующий свет $\lambda = 652$ нм для фоскана.

Результаты. Сравнительный анализ по различным параметрам фотосенсибилизаторов названных выше групп, примененных при ФДТ более чем у 1200 больных, с терапевтической эффективностью 98%, в том числе с полной резорбцией опухоли 74% и частичной резорбцией 24%. По прошествии 10 лет мы убедились в превосходных качествах фотосенсибилизаторов хлориновой группы при ФДТ самых различных локализаций рака. По данным специальной литературы в странах Европы, в США, Японии и др. странах наиболее распространенными фотосенсибилизаторами последнего десятилетия тоже являются различные производные хлориновой группы.

Заключение. Фотосенсибилизаторы хлоринового ряда при проведении сеансов ФДТ с использованием портативных, надежных и недорогих диодных лазеров обладают высокой фотодинамической активностью и терапевтической эффективностью, быстро выводятся из организма больных и, благодаря быстрому клиренсу, не вызывают длительной фотосенсибилизации кожи.

Стрельцова О.С., Снопина Л.Б., Орлова А.Г., Юнцова Е.Э., Загайнова Е.В.

КОМБИНИРОВАННАЯ ОПТИЧЕСКАЯ И ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ НГМА

Рак мочевого пузыря – полифокальная болезнь, которая может проходить различные стадии своего развития – от предраковых изменений с наличием атипии и дисплазии до выраженного инвазивного процесса.

Трудность диагностики обычно связана с тем, что ранняя неоплазия протекает в эпителиальном слое, часто без образования видимых папиллярных разрастаний и/или образует плоский подозрительный участок (*flat lesion, red patch zone*).

Флюоресцентная цистоскопия заняла достойное место и имеет достаточно высокие показатели для диагностики опухолей мочевого пузыря. Ранее проведенные нами исследования показали, что кросс-поляризационная оптическая когерентная томография (КПОКТ) имеет высокие общие диагностические показатели в определении раннего рака: чувствительность метода 93.7%; специфичность – 84%; диагностическая точность – 85.3%. КП ОКТ имеет достоверно более высокие диагностические показатели в определении ранней малигнизации ($p \leq 0.01$), чем традиционная ОКТ. Метод КП ОКТ позволяет преодолеть диагностические ограничения стандартной ОКТ.

Нашей целью было изучить возможности комбинированного применения флюоресцентной цистоскопии и кросс-поляризационной оптической когерентной томографии (КПОКТ).

Результаты комбинированного применения КПОКТ и флюоресцентной цистоскопии для диагностики раннего рака мочевого пузыря изучены у 52 пациентов. Выявлено, что из 199 выявленных подозрительных на неоплазию зон при флюоресцентной цистоскопии 36 были папиллярными опухолями и 163 – плоскими флюоресцирующими зонами.

Все 36 папиллярных опухолей были правильно распознаны традиционной цистоскопией, флюоресцентной диагностикой и КПОКТ. Следовательно, ни флюоресцентная диагностика, ни КПОКТ не дают дополнительной информации при детекции папиллярных опухолей. Особое внимание уделялось оценке возможностей ОКТ в верификации плоских подозрительных зон, то есть в диагностике раннего рака.

Из 163 плоских флюоресцирующих зон 150 были доброкачественными по данным гистологии и, следовательно, имели ложноположительную флюоресценцию. В 32 из 150 доброкачественных зон по данным КПОКТ получен подозрительный тип изображений – нарушена слоистая организация или контраст границы уротелий–подслизистый слой.

Следовательно, 21% ложноположительных флюоресцирующих зон были также ложноположительными по данным КПОКТ. В то же время 79% ложнофлюоресцирующих зон были верно распознаны КПОКТ как доброкачественные, и их можно было не резецировать. Из 28 плоских неопластических зон 24 были правильно распознаны ОКТ и имели подозрительный или раковый тип изображений. Только 3 зоны были отмечены как подозрительные в белом свете, остальные 25 были диагностированы флюоресцентной цистоскопией.

Среди них в 20 случаях выявлена дисплазия уротелия. При дисплазии уротелия в 16 случаях определялся подозрительный тип КПОКТ изображения, а в 4х – доброкачественный тип, они были оценены как ложноотрицательные случаи. В 8 случаях был детектирован рак *in situ*, при котором чаще определялся раковый тип КПОКТ изображения. Чувствительность нового метода диагностики рака мочевого пузыря на базе комбинированного использования КПОКТ и флюоресценции для плоских подозрительных зон составила – 86%, специфичность – 79%. При больших площадях флюоресценции слизистой мочевого пузыря (хроническое воспаление, плоскоклеточная метаплазия) КПОКТ позволит объективизировать изменения в этих зонах и сохранить максимальное количество здоровой слизистой. Метод КПОКТ может быть использован при мониторинге состояния мочевого пузыря после проведения ТУР, и перейти от эмпирического подхода в выборе диффузного варианта ФДТ к объективно доказанному выбору локального варианта лечения.

Торчинов А.М., Умаханова М.М., Дуванский Р.А., Аубекирова М.А., Садуллаева Э.Т.

ФДТ ФОНОВЫХ И ПРЕДРАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОМ ХЛОРИНОВОГО РЯДА «РАДАХЛОРИН»
ГОУ ВПО МГМСУ, Москва

Цель работы. Оценить эффективность лазерной ФДТ с фотосенсибилизатором хлоринового ряда «Радахлорин» в лечении фоновых и предраковых заболеваний шейки матки. Нами проанализированы результаты обследования и лечения 150 пациенток с фоновыми и предраковыми заболеваниями шейки матки. Больных с эктопией шейки матки было 98, лейкоплакией – 33, дисплазией I–II степени – II, эндометриозом шейки матки – 8. Обследование больных включало в себя: клиническое обследование; кольпоскопическое, микробиологическое, цитологическое и гистологическое исследования. В зависимости от применяемых методов лечения все больные распределены на 2 группы: в 1 группе (100 больных) лечение проводили диатермохирургическим методом; во 2 группе (50 больных) применяли ФДТ. Для ФДТ применяли фотосенсибилизаторы хлоринового ряда. ФДТ проводили в I фазу менструального цикла, что позволяло исключить наличие беременности. Для ФДТ применяли ФС хлоринового ряда «Радахлорин» в форме геля с содержанием активного вещества 0,3%, который наносили на патологическую зону эктоцервикса за 2 ч. до лазерного воздействия. Последнее осуществляли аппаратом с λ 660 нм в непрерывном режиме. Мощность на выходе 2,5 Вт, время воздействия 8–20 мин., плотность энергии 80-ФДТ250 Дж/см². Параметры времени и плотности энергии зависят от характера и площади патологического процесса. Применение ФДТ в лечении фоновых и предраковых заболеваний шейки матки позволило в 1,45 раза сократить сроки эпителизации по сравнению с диатермохирургическим методом и снизить число осложнений (при анализе ближайших результатов в группе ФДТ выявлено 9,6% неполных эпителизаций; в контрольной группе у 76,6% пациенток боли в нижних отделах живота, у 6,7% – кровотечение, у 30% – кольпит, у 20% – неполная эпителизация). Преимущества ФДТ: избирательная гибель патологических клеток без повреждения здоровых тканей, за счет селективного накопления ФС в патологических клетках и локального подведения света; отсутствие боли в ходе операции; отсутствие кровотечения; раннее начало краевой эпителизации; незначительная лейкоцитарная инфильтрация; сокращение фаз экссудации и пролиферации; отсутствие образования рубцовой ткани; сохранение анатомо-функциональной полноценности шейки матки.

А.З. Хашижоева, О.Б. Отдельнова, М.И. Ибрагимова

ФДТ С ПРИМЕНЕНИЕМ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ФОТОДИТАЗИН В ЛЕЧЕНИИ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В ГИНЕКОЛОГИИ
ГОУ ВПО РГМУ, Москва

ФДТ – метод воздействия на патологические ткани путем активации ФС светом с заданной λ с целью деструкции патологических клеток преимущественно по механизму апоптоза. Целью нашего исследования явилось изучение эффективности и переносимости метода ФДТ у пациенток с гиперпластическими процессами эндометрия (ГПЭ) и дистрофическими заболеваниями вульвы.

Материалы и методы. ФДТ была изучена при лечении 60 больных с ГПЭ и 10 пациенток с доброкачественными заболеваниями вульвы. По характеру выявленной патологии эндометрия больные распределялись таким образом: у 2 пациенток – атипичная гиперплазия эндометрия, у 10 больных простая гиперплазия без атипии и у 24 больных – сложная гиперплазия без атипии, у 24 пациенток выявлены полипы эндометрия. В группе пациенток с дистрофическими заболеваниями вульвы у 8 больных верифицирован склеротический лишай вульвы и у 2 – плоскоклеточная гиперплазия вульвы. Все пациентки с патологией эндометрия имели сопутствующую экстрагенитальную патологию различной степени выраженности, послужившую основанием для выбора в качестве метода лечения ФДТ. ФДТ была проведена с использованием ФС «Фотодитазин» в дозе 1 мг/кг и в случае заболевания вульвы в сочетании с местной аппликацией на патологический очаг вульвы 1 мл 0,5% геля-пенетратора «Фотодитазин». Световое воздействие проводили в непрерывном или фракционном режиме, длительность облучения составила 15–40 минут, при плотности энергии 150–300 Дж/см² на эндометрий и 100–250 Дж/см² для вульвы.

Результаты. У больных с ГПЭ эффективность ФДТ проводилась на основании данных ультразвукового исследования срединных маточных структур и гистероскопии. Так, к 6 месяцу наблюдения характерным явилось статистически значимое сокращение толщины М-эхо по сравнению с показателями до лечения, его средняя толщина составила 3,1±1,4 мм по сравнению с исходными предоперационными показателями. А через 2 года наблюдения при УЗИ органов малого таза у пациенток, перенесших ФДТ, выявлялись максимальные изменения характеристик М-эхо – уменьшение его размеров средних значений до цифр 2,7±0,3 мм. Диагностическая гистероскопия выполнялась через 12 месяцев после проведения процедуры у всех пациенток с атипичной гиперплазией эндометрия и у 18 больных с ГПЭ, получавших лечение методом ФДТ. Гистероскопическая картина была представлена атрофией эндометрия на фоне отсутствия облитерации полости матки. Рецидив гиперпластического процесса эндометрия, подтвержденный данными морфологического исследования, возник в сроки от 6 до 14 месяцев у 7 (11,6%) больных, причем, только у женщин с сопутствующей гинекологической патологией в виде аденомиоза и миомы матки. Повторный сеанс фотодинамической терапии у 6 пациенток (одна больная отказалась от дальнейшего лечения) закончился полной клинической ремиссией. Таким образом, общее число больных, излеченных с помощью ФДТ в течение 6–14 мес., достигло 59 (98,3%). Лечебный эффект после ФДТ при патологии вульвы оценивался визуально и на основании указаний на наличие или отсутствие зуда в области вульвы, а кроме того, подтверждался данными цитологического исследования.

Так, исчезновение зуда в области вульвы отмечено у 6 из 8 больных склеротическим лишаем. Всем больным плоскоклеточной гиперплазией проведены цитологическое исследование соскоба с вульвы и вульвоскопия, на основании которых было достоверно диагностировано клиническое излечение. Двум больным склеротическим лишаем вульвы потребовалось повторное проведение ФДТ ввиду сохраняющихся клинических симптомов заболевания, после чего был достигнут положительный лечебный эффект. Побочные реакции были отмечены во всех случаях и заключались в болевом синдроме после проведения процедуры ФДТ, что купировалось НПВС.

Выводы. Мониторинг отдаленных результатов лечения в группе пациенток с гиперплазией эндометрия показал, что ФДТ эффективна в 88,3% наблюдений, а в случаях рецидивов было возможно повторное проведение сеанса ФДТ с достижением полного клинического эффекта. Полная клиническая ремиссия в группе патологии вульвы отмечена у 8 из 10 больных. У 2 пациенток со склеротическим лишаем вульвы потребовалось проведение повторного сеанса ФДТ, после чего было диагностировано клиническое излечение.

Заключение. Метод фотодинамической терапии ГПЭ представляет собой новый способ лечения и может служить средством индивидуальной профилактики рака эндометрия. Полученные результаты клинической апробации метода ФДТ с использованием ФС Фотодитазин при лечении женщин с патологией вульвы неопухолевого генеза показали его высокую лечебную активность, минимальное кол-во побочных эффектов и осложнений, методическую простоту исполнения, что делает возможным реализацию ФДТ для лечения фоновых заболеваний вульвы в амбулаторных условиях.

М.В. Ширманова¹, И.В. Балалаева², М.А. Сироткина¹, А.Г. Орлова³, И.В. Турчин³, Загайнова Е.В.¹

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ МЕТОДОМ ДИФфуЗИОННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ТОМОГРАФИИ *IN VIVO*

¹НГМА

²НГУ им. Н.И. Лобачевского

³ИПФ РАН

Традиционно фармакокинетика новых препаратов для флуоресцентной диагностики и ФДТ в предклинических испытаниях на животных исследуется в основном инвазивными методами, которые требуют большого кол-ва материала и весьма трудоемки. Данная работа демонстрирует результаты прижизненного изучения фармакокинетики фотосенсибилизаторов с помощью нового метода оптической визуализации – диффузионной флуоресцентной томографии (ДФТ). Исследование выполнено с использованием препарата «Фотодитазин» (10 мг/кг, в/в), ФС (1 мг/кг, в/в), «Аласенс» (400 мг/кг, *per os*) на 87 мышцах линии СВА с перевитой опухолью РШМ-5. Флуоресцентные изображения получали *in vivo* на диффузионном флуоресцентном томографе ФДТ-2М (ИПФ РАН). Для определения концентрации фотосенсибилизаторов в опухолевой ткани выполнена калибровка интенсивности ДФТ-сигнала на модельной среде (липофундин, тушь). Полученные результаты показывают, что кинетика накопления фотосенсибилизаторов в опухоли отличается. Максимум накопления фотодитазина достигается к 1 ч, 5-АЛК-индуцированного протопорфирина IX – к 6, ФС – к 3 ч после введения препарата. Установлено, что по интенсивности ДФТ-сигнала возможна кол-ная оценка содержания фотосенсибилизатора в опухоли. По данным ДФТ содержание ФС в опухоли в максимуме накопления составляет порядка 6 мкг/г, фотодитазина – 0,25 мкг/г. Показано, что в органах брюшной полости и коже мышцей фотодитазин максимально накапливается к 2 ч, 5-АЛК-индуцированный ПпХ – к 6 ч, ФС – к 4 ч. Время выведения из организма составляет порядка 5, 3 и более 7 сут соответственно. Данные о фармакокинетики препаратов, полученные методом ДФТ *in vivo*, согласуются с данными стандартных флуоресцентных методов *ex vivo*.

Таким образом, метод ДФТ может служить хорошим инструментом в предклинических исследованиях для быстрого получения информации о фармакокинетических характеристиках потенциальных фотосенсибилизаторов.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АЛС – антилимфоцитарная сыворотка
АТГ – антиtimoцитарный глобулин
БКС – бинарная каталитическая система
ВРПС – водорастворимые полисахариды
ВЧД – внутричерепное давление
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
в/б – внутрибрюшинно
в/в – внутривенно
ГК – гепатоцеллюлярная карцинома
 бГК – быстрорастущая дедифференцированная гепатоцеллюлярная карцинома
 мГК – медленно растущая гепатоцеллюлярная карцинома
ГПВ/ГРВ – гликопептидная противоопухолевая вакцина /glycopeptide cancer vaccine
ДМБА – диметил- α -бензантрацена
ЗНО – злокачественные новообразования
ИДМ – иммунодефицитные мыши
ЛТ – лучевая терапия
МИБТ – медицинские иммунобиологические препараты
МЛ – моноклеарные лейкоциты
ММ – метамиелоцит(ы)
МКА – моноклональные антитела
ММ – множественная миелома
МРЛ – мелкоклеточный рак легкого
МРТ – магнитно-резонансная томография
НК – натуральные киллеры
НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого
НПАВ – неионогенные поверхностно-активные вещества
НПТ – наилучшая поддерживающая терапия
НСПВС – нестероидные противовоспалительные средства
НХЛ – неходжкинская лимфома
ОбО – объективный ответ
ОДС – оптическая диффузионная спектроскопия
ОО – отсутствие ответа
ОКТ – оптическая когерентная томография
ОЦ – окисленный целлюлоз
ОЦК – объем циркулирующей крови
ОП – опухолевой плеврит
РМЖ – рак молочной железы
 МР РМЖ – местнораспространенный рак молочной железы
 ОИФ РМЖ – отечно-инфильтративная форма рака молочной железы
РЭС – ретикулоэндотелиальная система
ПВП – поливинилпирролидон
ПЛ – пролиферация и дифференцировка
ПЗ – прогрессирование заболевания
ПО – полный ответ
ПОПР – полиоксипропилен
ПФОС – перфторорганические соединения
ППК – первичные половые клетки
ПК – периферическая кровь
ПХТ – полихимиотерапия
ПЯ – палочкоядерный
КРР – колоректальный рак
РКТ – рентгеновская компьютерная томография
РЛ – рак легкого
РМП – рак мочевого пузыря
РМЖ – рак молочной железы
РПК – рак прямой кишки
РПЖ – рак поджелудочной железы
РЭ – рецепторы эстрогенных гормонов
РЭМП – расширенная экстирпация матки с придатками
РШМ – рак шейки матки
СЗП – свежзамороженная плазма
СПС – сосудисто-подобные структуры
СПЖ – средняя продолжительность жизни
СЯ – сегментоядерный
ТСХ – тонкослойная хроматография
УЗКТ – ультразвуковая компьютерная томография
ФД – флуоресцентная диагностика
ФС – фотосенс
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
ФСП – фармакопейная статья предприятия
ФТС – фетальная телячья сыворотка
ХГ – хорионический гонадотропин
ХЛЛ – хронический лимфоцитарный лейкоз
ХТ – химиотерапия
ЛСП – лимфосаркома Плисса
ЦП – цисплатин
ЦФ – циклофосфан
ЧО – частичный ответ
ШМ – шейка матки
ЭФР – эпидермальный фактор роста
СОХ – циклооксигеназа
EPR effect – enhanced permeability and retention effect (эффект повышения проницаемости и удерживания)
LDCI – Lomustine-Dacarbazine-Cisplatin-Ingaron
LLC – lung Lewis carcinoma (карцинома легких Льюис)
Mw – molecular weight (молекулярный вес)
HER – human epidermal growth factor receptor
TGF – Transforming Growth Factors (трансформирующие факторы роста)
VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor

УДК 616-006.04-092.4:615.831:577.352.2

Чан Тхи Хай Иен¹, В.И. Поздеев², Г.А. Меерович³, С.Ш. Каршиева², Л.М. Борисова²,
О.Л. Орлова², А.П. Полозкова², Г.В. Раменская¹, Н.А. Оборотова²

ЛИПОСОМАЛЬНАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА ФОТОДИТАЗИНА¹ММА им. И.М. Сеченова, Москва²РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва³Институт общей физики им. А.М.Прохорова РАН, Москва**Контактная информация:**

Чан Тхи Хай Иен, аспирантка кафедры фармацевтической химии с курсом токсикологической химии
фармацевтического факультета

адрес: 119991, Москва, Трубецкая ул., д. 8, стр.2; тел.: +7(965)332-82-57

e-mail: tran_yen234@mail.ru

Статья поступила: 12.03.2010, принята к печати 01.04.2010.

Резюме

Фотосенсибилизатор второго поколения фотодитазин на основе производного хлорина e₆ активно изучается в последнее время для фотодинамической терапии поверхностных и внутриполостных новообразований. Целью данной работы является получение пегилированной липосомальной лекарственной формы фотодитазина. Включение фотодитазина в свежеприготовленные липосомы составило 92,1±0,9%, диаметр везикул – 178±10 нм. Применение фотодитазина в виде полученной липосомальной дисперсии по сравнению с водным раствором позволяет повысить на 15–20% селективность накопления препарата в опухоли по сравнению с нормальной тканью и существенно замедлить рост опухоли Эрлиха.

Ключевые слова: фотодитазин, липосомы, фотодинамическая терапия, опухоль Эрлиха.

Tran Thi Hai Yen¹, V.I. Pozdееv², G.A. Meerovich³, S.Sh. Karshieva², L.M. Borisova²,
O.L. Orlova², A.P. Polozkova², G.V. Ramenskaya¹, N.A. Oborotova²

CHLORIN DERIVATIVES IN CANCER PHOTODYNAMIC THERAPY¹I.M. Sechenov Moscow Medical Academy²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow³A.M. Prokhorov General Physics Institute of RAS, Moscow**Abstract**

Photoditazine, the derivative of chlorine e₆, belong to second generation of photosensitizers. At present this drug is under active examination to treat superficial and intracavitary malignant tumors. The aim of this study was to prepare pegylated liposomal form of photoditazine. The inclusion of photoditazine into fresh prepared liposomes was 92,1±0,9 %, the vesicle diameter was 178±10 nm. Such liposomal dispersion of photoditazine increased the selective accumulation of drug in tumor about 15–20 % in compare to normal tissue and significantly reduced the Ehrlich's tumor.

Key words: Photoditazine, liposomes, photodynamic therapy, Ehrlich's tumor.

Введение

Фотосенсибилизатор второго поколения фотодитазин на основе водного раствора ди-N-метилглюкаминной соли хлорина e₆ активно изучается в последнее время для ФДТ поверхностных и внутриполостных новообразований [5]. Фотодитазин быстро [3] накапливается в опухоли (максимум накопления наступает через 2–3 ч) и быстро выводится из организма (98 % препарата – через двое суток [4]). Недостатком фотодитазина является его нестабильность при длительном хранении в водном растворе. В этих условиях наблюдается снижение растворимости препарата, а также частичное химическое разрушение молекул фотодинамически активной субстанции, что сопровождается снижением квантового выхода, а, следовательно, снижением цитотоксического действия.

Одним из возможных путей решения проблемы является создание липосомальной формы препарата (можно лиофилизировать и хранить при пониженной температуре). Однако предложенный Ю.А. Белым и др. [1] способ создания липосомальной формы производных хлорина e₆ позволил получить непегилированные липосомы с низким включением

фотодинамически активной субстанции во внутрилипосомальный объем. Из-за необходимости отделения липосом от невключившегося препарата методом колоночной хроматографии была получена сильно разбавленная липосомальная дисперсия, которую нужно было концентрировать перед использованием. Кроме того, липосомы в виде водной дисперсии подвергаются гидролизу и физическим изменениям в процессе хранения, включая частичный выход фотодитазина из внутрилипосомального объема в супернатант, а также изменение размеров в результате агрегации или слияния.

Задача исследования

Получение новой липосомальной лекарственной формы фотодитазина, которая позволила бы обеспечить:

- увеличение селективности накопления препарата в опухолевой ткани по сравнению с нормальной;
- повышение эффективности ФДТ при использовании фотодитазина;
- улучшение стабильности препарата при хранении.

Материалы и методы**Получение липосом с фотодитазином**

Липосомы с фотодитазином получали методом Bangham [7]. *Растворяли в 20 мл хлороформа в круглодонной колбе вместимостью 2 л. Органический растворитель упаривали на роторном испарителе под вакуумом при 37 °С до образования липидной пленки. Пленку сушили при 37 °С под вакуумом в течение 2 ч.

Далее липидную пленку гидратировали раствором фотодитазина при 37 °С и постоянном перемешивании. Образовавшуюся дисперсию мультимеллярных везикул экстрадировали через поликарбонатные фильтры Whatman (Великобритания) с размером пор 200 нм с помощью ручного мини-экструдера Avanti Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids, Inc., США).

К полученным липосомам с фотодитазином прибавляли раствор криопротектора и дополнительные средства, способствующие удержанию препарата во внутрилипосомальном объеме. Для стабилизации липосом с фотодитазином проводили сублимационную сушку [2].

Анализ среднего диаметра везикул проводили с помощью фотонного корреляционного анализатора Nicomp 380 Submicron Particle Sizer (Particle Sizing Systems, США).

Содержание фотодитазина в липосомальной лекарственной форме определяли методом спектрофотометрии с использованием рабочего стандартного образца (PCO) при λ 662 нм.

Изучение селективности накопления липосомальной дисперсии фотодитазина в опухоли Эрлиха мышей

Для изучения фармакокинетики фотодитазина *in vivo* опухоль Эрлиха перевивали взвесью клеток внутримышечно в голень правой задней лапы мышам F₁. Мышей делили на 2 группы (n=3). Фармакокинетические исследования проводили на 4–5 сут после трансплантации опухоли.

Мыши первой группы получала фотодитазин в/в по 5 мг/кг в липосомальной форме, а мыши второй – в тех же дозе и режиме введения только в водном растворе. Для оценки селективности накопления фотосенсибилизатора применяли спектрально-флуоресцентный метод с использованием волоконного спектроанализатора «ЛЭСА-01-Биоспек» и He-Ne лазера (Биоспек, Россия).

Измерения интенсивности флуоресценции при возбуждении He-Ne лазером проводили в нескольких точках опухоли, полученные данные усредняли.

Аналогично оценивали интенсивность флуоресценции нормальной ткани в контралатеральной зоне левой лапы.

Индекс селективности накопления фотосенсибилизатора оценивали как соотношение средней интенсивности его флуоресценции в опухоли и нормальной ткани (в предположении, что интенсивность флуоресценции фотосенсибилизатора в ткани пропорциональна его содержанию в ней).

Данные по индексу накопления усредняли по каждой группе животных. Проводя такие измерения в различные моменты времени, получили кривую динамики индекса накопления фотодитазина при введении в обеих формах.

*Яичный фосфатидилхолин : холестерин :
1,2-дистеароил-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000]
амонниевая соль (DSPE-PEG-2000) (300:100:10 μ моль)

Изучение эффективности ФДТ липосомальной дисперсии фотодитазина на опухоли Эрлиха мышей

Сравнительные исследования терапевтической эффективности полученной липосомальной дисперсии и водного раствора фотодитазина проводили *in vivo* на 3 группах мышей Balb/c (n=7), в качестве контроля (группа 3) были использованы интактные мыши. Опухоль Эрлиха (ELD) перевивали внутримышечно в голень правой задней лапы по 0,1 мл взвеси, содержащей 5×10^5 клеток.

Лечение мышей начинали на 6 сут после трансплантации опухоли, когда средний объем опухолей в группах не превышал 530 мм³.

Мышам первой группы за 4,5 ч до облучения вводили внутривенно липосомальную дисперсию фотодитазина в дозе 5 мг/кг массы тела животного, мышам второй группы – водный раствор фотодитазина в той же дозе. При ФДТ опухоли облучали с помощью лазера «ЛФД-01/670-Биоспек» (Биоспек, Россия) с λ 671 нм и плотностью мощности до 260 мВт/см² в течение 20 мин.

Оценку эффективности ФДТ оценивали по торможению роста опухоли (ТРО %) в разные сроки наблюдения. Торможение роста опухоли рассчитывали по формуле:

$$TPO, \% = \frac{(Vk - Vo)}{Vk} \times 100, \text{ где}$$

Vk – средний объем опухоли в контрольной группе (мм³),
Vo – средний объем в опытной группе (мм³).

Полученные данные обрабатывали статистически с помощью доверительного интервала по методу Фишера – Стьюдента. Различия считались статистически достоверными при $p \leq 0,05$. Результаты приведены в таблице.

Результаты и обсуждение

Включение фотодитазина в свежеприготовленные липосомы составило $92,1 \pm 0,9$ %, диаметр везикул – 178 ± 10 нм.

После сублимационной сушки липосом и их последующей регидратации деионизированной водой включение фотодитазина незначительно изменилось ($86,5 \pm 0,8$ %), частицы укрупнились до 186 ± 8 нм. Такие размеры пегилированных липосом вполне приемлемы для их продолжительной циркуляции в кровотоке [6].

Результаты биологических исследований показывают, что введение фотодитазина в виде полученной липосомальной дисперсии по сравнению с водным раствором позволяет повысить на 15–20 % селективность накопления в опухоли по сравнению с нормальной тканью (рис. 1).

Рост ELD после ФДТ существенно замедляется (рис. 2), что свидетельствует о высокой фотодинамической эффективности этой липосомальной дисперсии. В группе с водным раствором фотодитазина значимый эффект достигается только к концу наблюдения, ТРО=57 % ($p \leq 0,05$), в то время как липосомальный фотодитазин вызывает значимое торможение роста опухоли уже на 8 сут после лечения (ТРО=58 %, $p \leq 0,05$) и достигает максимальной величины к 23 сут, ТРО=86 % ($p \leq 0,05$).

Таблица

Эффективность ФДТ с использованием фотодитазина на мышах с ELD

Группы	Доза, путь введения	ТРО %					
		на сутки после облучения					
		4	8	11	15	18	23
Фотодитазин раствор	5 мг/кг в/в	27	48	39	44	48	57
Фотодитазин липосомальный	5 мг/кг в/в	36	58	61	76	83	86

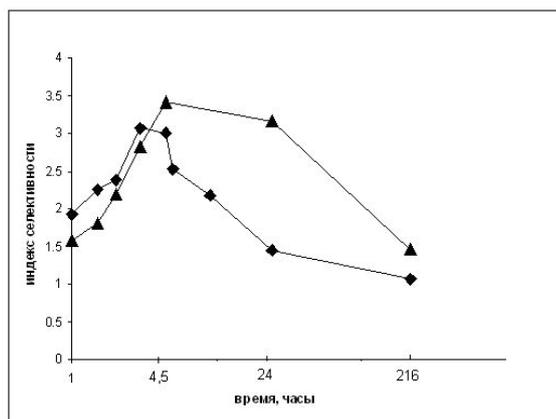


Рис. 1. Индекс накопления фотодитазина в ELD по сравнению с нормальной тканью при введении в дозе 5 мг/кг массы при внутривенном введении:

- 1 – в виде полученной липосомальной дисперсии;
- 2 – в виде водного раствора. анат алек

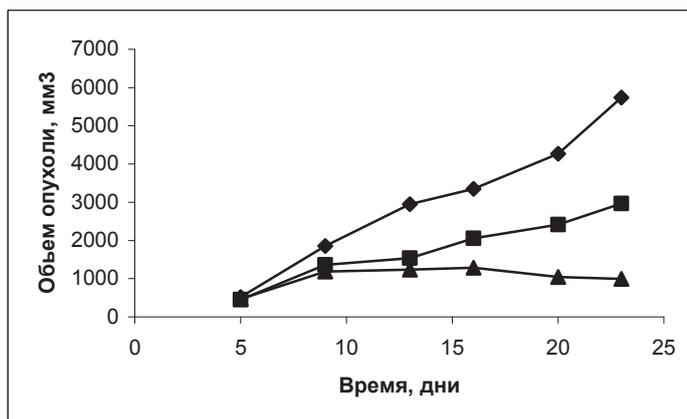


Рис. 2. Динамика роста ELD после ФДТ при внутривенном введении фотодитазина в дозе 5 мг/кг:

- 1 – в виде полученной липосомальной дисперсии;
- 2 – в виде водного раствора;
- 3 – контрольная группа.

Лиофилизированная липосомальная форма фотодитазина может храниться при пониженной температуре, сохраняя ее противоопухолевую активность в течение длительного времени. В настоящее время исследования продолжаются, данные о стабильности препарата при хранении будут опубликованы после их завершения.

Выводы

1. Получена липосомальная дисперсия фотодитазина с размером частиц не более 180 нм с включением препарата в везикулы не менее 92 %.
2. Селективность накопления фотодитазина в опухоли по сравнению с нормальной тканью при использовании липосомальной дисперсии повысилась на 15–20 % по сравнению с водным раствором фотодитазина.
3. Наблюдали высокую эффективность фотодинамической терапии липосомальным фотодитазинном на опухоль Эрлиха в терапевтической дозе 5 мг/мл (ТРО = 86 %).

Литература

1. Белый Ю.А., Терещенко А.В., Володин П.Л. и др. Способ фотодинамической терапии и электрохимической деструкции меланомы хориоидеи. Патент РФ № 2303964 от 10 августа 2007 г.
2. Грегориадис Г., Зади Б., Джайасекера П.Н. Способ получения липосом. Патент РФ № 2216316 от 16 июня 1999 г.
3. Загайнова Е.В., Ширманова М.В., Сироткина М.А. и др. Мониторинг накопления фотосенсибилизаторов в опухоли методом диффузионной и флуоресцентной томографии // Российский биотерапевтический журнал. – 2008. – Т. 7, № 4. – С. 30–5.
4. Пономарев Г.В., Тавровский Л.Д., Зарецкий А.М. и др. Фотосенсибилизатор и способ его получения. – Патент РФ №2276976 от 27 мая 2006 г.
5. Фотодитазин. <http://www.fotoditazin.ru> (дата обращения: 5.03.2010).
6. Awasthi V.D., Garcia D., Goins B.A., Phillips W.T. Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various sizes in rabbits // Int J Pharm. – 2003. – 253(1–2). – P. 121–32.
7. Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C. Diffusion of Univalent Ions across the lamellae of Swollen Phospholipids // J. Mol. Biol. – 1965. – 13. – P. 238–52.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Руководство по гематологии под ред. А.И. Воробьева. – Т. 2. – М.: Ньюдиамед, 2004. – 277 с.

Bihrl R., Libertino J.A. Renal cell cancer with extension into the vena cava. In: Dekernion B.J., Ravone-Macaluso M. eds., Tumors of kidney. – Baltimore: Williams&Wilkins, 1986. – P. 111–123.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Издание 2-е, переработанное и дополненное

ЭНЦИКЛОПЕДИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ

Платиновый спонсор



Group

sanofi aventis

Главное – здоровье

Готовится к печати
Издательская группа РОНЦ

Зофран®

ондансетрон

ДОБИВАЯСЬ БЕЗОГОВОРЧНОГО ШТИЛЯ

КОНТРОЛИРУЯ симптомы тошноты и рвоты столько, сколько потребуется

ВЫБИРАЯ удобную схему для профилактики и терапии тошноты и рвоты, вызванной химиотерапией

ОПИРАЯСЬ на максимальный мировой опыт антиэметической терапии



GlaxoSmithKline
Oncology

За дополнительной информацией обращайтесь к компании ЗАО «ГлэксСмитКлайн Тройдинг» по адресу: Россия, 121614, Москва, вн. Крайний округ, 17 (бизнес-парк «Крылатское Холл»), корп. 3, 5-й этаж
Тел: (495) 777 89 00, факс: (495) 777 89 01.

