

Учреждение Российской академии медицинских наук
Российский онкологический научный центр
имени Н. Н. Блохина РАМН

ВЕСТНИК РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН

УДК 616
Ежеквартальный научно-практический журнал по онкологии
Основан в ноябре 1990 г.

**Том 23, №1 (87)
Январь — март 2012 г.**

Учредитель:
Учреждение Российской академии медицинских наук
Российский онкологический научный центр
имени Н. Н. Блохина РАМН

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:
М. И. Давыдов, академик РАН и РАМН, проф., г. м. н.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:
В. Ю. Сельчук, проф., г. м. н. (зам. главного редактора)
В. М. Нечушкина, к. м. н. (отв. секретарь)
М. Д. Алиев, академик РАН и РАМН, проф., г. м. н.
А. Ю. Барышников, проф., г. м. н.
В. Н. Богатырев, проф., г. м. н.
Л. В. Демидов, проф., г. м. н.
Б. И. Долгушин, чл.-корр. РАМН, проф., г. м. н.
Д. Г. Заридзе, чл.-корр. РАМН, проф., г. м. н.
И. Б. Зборовская, к. б. н.
А. И. Карселадзе, проф., г. м. н.
Б. П. Копнин, проф., г. б. н.
В. В. Кузнецов, проф., г. м. н.
В. П. Летягин, проф., г. м. н.
В. Б. Матвеев, проф., г. м. н.
М. И. Нечушкин, проф., г. м. н.
Б. К. Поддубный, проф., г. м. н.
В. Г. Поляков, академик РАМН, проф., г. м. н.
С. Субраманиан
Н. Н. Тупицын, проф., г. м. н.
С. А. Тюляндин, проф., г. м. н.
Ю. В. Шишкин, проф., г. м. н.

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере
связи, информационных технологий и массовых коммуникаций
Свидетельство ПИ № ФС77-36649 18.06.2009

Подписной индекс в каталоге агентства «Роспечать» 46782

Цена договорная

За публикацию журнала отвечает отдел международных связей
РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН

Редакторы: М. Н. Соловова, А. Я. Подольская, О. Б. Одинцева (англ. яз.)
Технический редактор: М. Г. Петров
Корректор: Н. Н. Юдина

Адрес редакции: 115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24
Тел.: +7-499-324-5537. E-mail: vestnikronc@mail.ru

Подписано в печать 31.03.2012. Формат 60 × 90/8. Усл. печ. л. 9,3.
Тираж 3000 экз. Заказ № 871

АНО «Усия», 125581, РФ, г. Москва, ул. Фестивальная, д. 22, к. 6
© РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, 2012

При перепечатке материалов ссылка на «Вестник РОНЦ
им. Н. Н. Блохина РАМН» обязательна

Russian Academy of Medical Sciences
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center

JOURNAL of N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS

A quarterly journal of oncological science and practice
Founded in November 1990

**Volume 23, N 1 (87)
January – March 2012**

Founder:
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS

EDITOR-IN-CHIEF
M. I. Davydov, MD, PhD, DSc, Academician of RAS and RAMS, Professor

EDITORIAL BOARD:
V. Y. Selchuk, MD, PhD, DSc, Professor (Deputy Editor-in-Chief)
V. M. Nechushkina, MD, PhD (Executive Editor)
M. D. Aliev, MD, PhD, DSc, Academician of RAS and RAMS, Professor
A. Y. Baryshnikov, MD, PhD, DSc, Professor
V. N. Bogatyrev, MD, PhD, DSc, Professor
L. V. Demidov, MD, PhD, DSc, Professor
B. I. Dolgushin, MD, PhD, DSc, Associate Member of RAMS, Professor
A. I. Karseladze, MD, PhD, DSc, Professor
B. P. Kopnin, MD, PhD, DSc, Professor
V. V. Kuznetsov, MD, PhD, DSc, Professor
V. P. Letyagin, MD, PhD, DSc, Professor
V. B. Matveev, MD, PhD, DSc, Professor
M. I. Nechushkin, MD, PhD, DSc, Professor
B. K. Poddubniy, MD, PhD, DSc, Professor
V. G. Polyakov, MD, PhD, DSc, Academician of RAMS, Professor
Y. V. Shishkin, MD, PhD, DSc, Professor
S. Subramanian, MD
S. A. Tjulandin, MD, PhD, DSc, Professor
N. N. Tupitsyn, MD, PhD, DSc, Professor
D. G. Zaridze, MD, PhD, DSc, Associate Member of RAMS, Professor
I. B. Zborovskaya, MSc, PhD

The journal is registered with the Russian Federal Service for Supervision
in the Spheres of Telecommunications, Information Technologies and Mass
Communication. License ПИ N ФС77-36649 18.06.2009

Subscription index in catalogue of Rospechat Agency 46782

Price as per contract

Publishing in-charge: Office of International Affairs N. N. Blokhin Russian
Cancer Research Center RAMS

Editors: M. N. Solovova, A. Y. Podolskaya, O. B. Odintseva (English version)
Technical editor: M. G. Petrov
Proof-reader: N. N. Yudina

Address of the Editorial Office: 24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478.
Tel.: +7-499-324-5537. E-mail: vestnikronc@mail.ru

Permitted for print 31.03.2012. Format 60 × 90/8. Bulk 9.3 printed sheets.
Circulation 3000 copies. Order N 871

АНО «Усия», 22-6, Ulitsa Festivalnaya, Moscow, Russian Federation, 125581
© N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, 2012

No reproduction is permitted without reference to the Journal of
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

*А. О. Апрощенко, И. Е. Хатьков, Ю. А. Барсуков, В. А. Алиев, Д. В. Кузьмичев,
Р. И. Тамразов, П. С. Тютюнник*

**ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ ЛАПАРОСКОПИЧЕСКОЙ ХИРУРГИИ
В ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ КОЛОПРОКТОЛОГИИ** 3

Г. А. Белицкий, М. Г. Якубовская

**ИНФЕКЦИОННЫЕ КЛОНЫ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК (К 135-ЛЕТИЮ ПЕРВОЙ ПЕРЕВИВКИ ОПУХОЛИ
М. А. НОВИНСКИМ И 110-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ А. М. ШАБАДА)** 11

М. Б. Дюкалова

**РАЗРАБОТКА ПЕПТИДНЫХ ВАКЦИН ДЛЯ АКТИВНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ,
АССОЦИИРОВАННОГО С ГИПЕРПРОДУКЦИЕЙ ОНКОБЕЛКА HER-2** 19

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Л. В. Спирина, И. В. Кондакова, Е. А. Усынин, З. А. Юрмазов

**РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ И ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ
ПРОТЕОСОМНОЙ СИСТЕМОЙ ПРИ МЕТАСТАЗИРОВАНИИ РАКА ПОЧКИ** 27

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

*В. Н. Кондратова, Н. А. Пирогова, В. Н. Степина, Б. К. Погдубный,
Е. Г. Матякин, В. Э. Гурцевич, А. В. Лихтенштейн*

МАРКЕРЫ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА—БАРР ПРИ РАКЕ НОСОГЛОТКИ 33

Т. Ф. Маливанова, В. А. Юрченко, Е. В. Скоромыслова, Н. Н. Мазуренко
**ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА -308(G/A)TNF НА ОБЩУЮ ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ
РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ** 40

Д. А. Шаповалов, В. М. Нечушкина, И. Г. Комаров, А. В. Налбангян

СЕЛЕКТИВНАЯ ТАЗОВАЯ ЛИМФАДЕНЭКТОМИЯ ПРИ РАКЕ ТЕЛА МАТКИ 45

*Л. С. Яковлева, Н. Б. Сенюта, В. Н. Степина, Е. В. Гончарова, Л. Н. Щербак,
С. М. Джаббаров, В. Э. Гурцевич*

**ВИРУС ЭПШТЕЙНА—БАРР У БОЛЬНЫХ РАКОМ НОСОГЛОТКИ: ВАРИАНТЫ ГЕНА LMP1,
ГУМОРАЛЬНЫЙ ОТВЕТ И КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ БОЛЕЗНИ** 54

ДИСКУССИЯ

*А. И. Павловская, Т. Т. Кондратьева, Н. П. Велижева, С. В. Петров, Н. В. Балатенко,
С. Субраманиан*

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРИНЦИПЫ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО
РАКА ЛЕГКОГО НА МАЛОМ БИОПСИЙНОМ И ЦИТОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ** 62

*Н. Т. Талахадзе, С. Зуррида, И. К. Воротников, Н. В. Чхиквадзе, М. И. Нечушкин,
А. В. Петровский, П. Арноне, Д. Лиссидини, Д. Виале, У. Веронези*

**КЛАССИФИКАЦИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
ПО СИСТЕМЕ TNM: НЕОБХОДИМОСТЬ ПЕРЕМЕН** 69

ЮБИЛЕИ

**ЧЛЕН-КОРРЕСПОНДЕНТ РАМН, ПРОФЕССОР Б. И. ДОЛГУШИН
(К 60-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ)**

77

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

Андрей Олегович Атрощенко¹, Игорь Евгеньевич Хатьков²,
Юрий Андреевич Барсуков³, Вячеслав Афандиевич Алиев⁴,
Дмитрий Владимирович Кузьмичев⁵, Расим Ильхамович Тамразов⁶,
Павел Станиславович Тютюнник⁷

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ ЛАПАРОСКОПИЧЕСКОЙ ХИРУРГИИ В ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ КОЛОПРОКТОЛОГИИ

¹ Аспирант, кафедра факультетской хирургии № 2, Московский государственный медико-стоматологический университет (127473, РФ, г. Москва, ул. Десятская, г. 20, стр. 1)

² Д. м. н., профессор, заведующий, кафедра факультетской хирургии № 2, Московский государственный медико-стоматологический университет (127473, РФ, г. Москва, ул. Десятская, г. 20, стр. 1)

³ Д. м. н., профессор, заведующий, отделение проктологии НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁴ К. м. н., старший научный сотрудник, отделение проктологии НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁵ К. м. н., научный сотрудник, отделение проктологии НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁶ К. м. н., старший научный сотрудник, отделение проктологии НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁷ Аспирант, кафедра факультетской хирургии № 2, Московский государственный медико-стоматологический университет (127473, РФ, г. Москва, ул. Десятская, г. 20, стр. 1)

Адрес для переписки: 115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24,
НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН, отделение проктологии,
Атрощенко Андрей Олегович; e-mail: dr.atroshchenko@gmail.com

В статье подробно изложена история развития лапароскопической хирургии в проктологии. На основании большого обзора литературы показаны возможность и большое значение малоинвазивных методов в различных разделах хирургии. Результатами ряда клинических исследований обоснована целесообразность использования лапароскопии в онкопроктологии с учетом обязательного соблюдения основных принципов онкохирургии (высокая перевязка сосудов, адекватная лимфодиссекция, соблюдение методики «don't touch»). Данная концепция позволяет с оптимизмом смотреть на перспективы для дальнейшего улучшения результатов лечения этого тяжелого контингента пациентов, обеспечения ранней социальной и трудовой реабилитации больных колоректальным раком.

Ключевые слова: лапароскопическая хирургия, онкология, онкопроктология, колоректальный рак.

Колопроктология в настоящее время — одно из наиболее быстро развивающихся направлений эндовидеохирургии. Лапароскопическая колоректальная хирургия зародилась в начале 90-х годов XX века, когда Moises Jacobs в Майами, штат Флорида, в июне 1990 г. выполнил первую в мире лапароскопически ассистированную правостороннюю гемиколэктомию с формированием экс-

тракорпорального анастомоза через минилапаротомный разрез [1]. В этом же году P. Lahey произвел резекцию сигмовидной кишки, а D. Flower — левостороннюю гемиколэктомию по поводу рака. В последующем в литературе все чаще стали появляться сообщения о выполнении лапароскопических вмешательств при воспалительных и опухолевых заболеваниях толстой кишки. Однако к 1994 г. было опубликовано лишь 17 работ, посвященных лапароскопическим вмешательствам на толстой кишке. В 1994 г. W. Geis разработал классификацию, отражающую степень сложности технического исполнения

операций в порядке возрастания: правосторонняя гемиколэктомия, резекция сигмовидной кишки, операция Гартмана, резекция прямой кишки, брюшно-анальная резекция прямой кишки, левосторонняя гемиколэктомия, резекция поперечной ободочной кишки. Автор выделил 3 основных этапа операции: эндоскопическая мобилизация, выделение и перевязка питающих сосудов, формирование анастомоза [2].

Лапароскопическая хирургия в онкопроктологии имеет целый ряд технических особенностей: необходимость в визуализации сразу нескольких отделов брюшной полости, возможность перемещения мобилизованной кишки из одного поля действия в другое, необходимость широкого рассечения брюшины и мобилизации брыжейки кишки и ее клетчатки с регионарными лимфатическими узлами. Практически при всех операциях имеется необходимость в пересечении кишки, формировании межкишечного анастомоза.

Дальнейшее развитие лапароскопии в колоректальной хирургии связано с совершенствованием и появлением новых методов остановки кровотечения, улучшением качества визуализации и передачи видеосигнала. Внедрение новых сшивающих аппаратов позволило значительно сократить продолжительность хирургического вмешательства, снизить число послеоперационных осложнений и несостоятельности швов анастомоза.

Появление аппаратов для формирования механического шва в хирургии берет свое начало в 1908 г., когда хирург из Будапешта Н. Hulth впервые сконструировал и применил сшивающий аппарат с четырьмя рядами скобок из нильзебаума (сплава серебра) и ножом, рассекающим ткань между ними. Для обеспечения надежного гемостаза скобки располагались в шахматном порядке. Затем в разработку сшивающих хирургических аппаратов активно включились такие страны, как Германия (V. Petz), Япония (Nakayama), а после Отечественной войны и СССР, где был создан Институт хирургических аппаратов и инструментов (ВНИИХАИ). За три послевоенных десятилетия Советский Союз стал безусловным мировым лидером по конструированию и производству сшивающих аппаратов, были запатентованы сотни моделей и модификаций, созданы передовые для своего времени аппараты УО, УКЛ, УБ, АКА, СПТУ, некоторые модели даже экспортировались за границу. Однако с конца 60-х годов в СССР это направление исследований резко сократилось, и центр передовых технологий автоматизированного шва переместился в Америку, где на основе закупленных советских патентов стали производиться новые модификации стэплеров.

В настоящее время применяются устройства различных производителей, адаптированные для применения в эндовидеохирургии. Диаметр устройств для формирования линейного шва составляет 12 мм, что позволяет использовать их без расширения доступа, а вращающаяся и артикулирующая рабочая часть делает удобной работу такими инструментами в труднодоступных местах брюшной полости и малого таза. Важной особенностью является наложение трехрядного скобочного шва, при котором не требуется дополнительная перитонизация, а интегрированное в аппарат лезвие обеспечивает аккуратное пересечение тканей между линиями швов [3; 4].

По мере накопления опыта и совершенствования оборудования выявляется все больше преимуществ малоинвазивных технологий в колоректальной хирургии перед традиционными операциями. За последние 18 лет эндовидеохирургия активно внедрена при лечении многих патологических процессов толстой кишки. Например, Н. Tomita и соавт. [5] считают их бесспорно показанными для дифференциальной диагностики, лечения доброкачественных заболеваний толстой кишки и полости таза: полипы и семейный диффузный полипоз, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, дивертикулез и долихосигма, функциональные нарушения, эндометриоз, выпадение прямой кишки, а также выполнение паллиативных вмешательств при колоректальном раке (КРР), формирование колостом и обходных анастомозов.

Эффективность лечения злокачественных новообразований толстой кишки с использованием радикальных лапароскопических вмешательств остается темой для дискуссий в научном мире. Причиной для разногласий является спор о возможности соблюдения основных принципов онкохирургии: адекватной интраоперационной ревизии, «высокой» перевязки сосудов, лимфодиссекции, соблюдения методики «don't touch» и абластики в условиях карбоксиперитонеума. Рандомизированные исследования, основанные на сравнительной оценке отдаленных результатов той и другой методики, отсутствуют. Возникает много споров о частоте возникновения троакарных метастазов. Ряд исследователей считают оправданным применение эндовидеохирургии при выполнении паллиативных резекций, формировании обходного анастомоза, колостом у больных с генерализованными формами КРР [6; 7]. Американское общество колоректальных хирургов в руководстве для практических врачей 1994 г. рекомендовало воздерживаться от выполнения лапароскопических операций по поводу злокачественных опухолей толстой кишки, за исключением специально организованных исследований [8].

В современной литературе широко обсуждается вопрос определения показаний и противопоказаний к выполнению лапароскопических вмешательств у онкологических больных. В настоящее время между различными авторами нет единства мнений по данным вопросам. Если раньше недостаточная эффективность эндовидеохирургических методов гемостаза и большая продолжительность операций вызывали сомнения в возможности безопасного проведения обширных и длительных вмешательств, то уже на протяжении ряда лет возможности метода не имеют существенных ограничений и полностью лапароскопическим способом выполняются операции практически любой сложности, такие, как радикальная лапароскопическая панкреатодуоденальная резекция.

Известные противопоказания к проведению лапароскопических операций у онкологических больных можно разделить на общие (связанные с соматическим статусом пациента, общей тяжестью состояния и декомпенсацией функций органов и систем) и местные (обусловленные особенностями опухолевого процесса и состоянием органов брюшной полости).

Общими противопоказаниями принято считать декомпенсированную недостаточность респираторной и сердечно-сосудистой систем, коагулопатию и патоло-

гическое ожирение. Однако совершенствование техники лапароскопических операций, достижения современной анестезиологии и реаниматологии, появление новых медицинских препаратов позволили применить данную методику даже у пациентов с высокой степенью операционного риска. В работах W. Böhm и соавт. [9] продемонстрирована возможность лапароскопических вмешательств при сердечно-сосудистой патологии. R. Veldkamp и соавт. [10] показали, что пожилой возраст и патологическое ожирение не являются противопоказанием к лапароскопическим операциям у онкологических больных. M. Canis и соавт. [11] отмечают, что недостатки, связанные с негативным влиянием пневмоперитонеума на центральную гемодинамику, можно устранить при использовании безгазовой лапароскопии. J. H. Marks и соавт. [12] отметили, что у пациентов с выраженными сочетанными и конкурирующими заболеваниями, относящихся к группе высокого риска, значительно снижаются количество послеоперационных осложнений и летальность после лапароскопических вмешательств. К группе высокого риска авторы относят пациентов старше 80 лет, лиц с патологическим ожирением (индекс масс тела более 30 кг/м²), перенесших лучевую терапию в предоперационном периоде или имеющих высокий операционно-анестезиологический риск (3 или 4 по классификации ASA). Высокий уровень подготовки хирургической бригады позволяет эффективно использовать лапароскопические операции у всех пациентов, относящихся к группе высокого риска, а хорошие результаты подобных операций являются аргументом против рассмотрения пожилого возраста, патологического ожирения, высокого операционно-анестезиологического риска и предоперационной лучевой терапии в качестве противопоказаний к лапароскопическим вмешательствам у онкологических больных.

Местные противопоказания к лапароскопическим операциям обусловлены особенностями распространения опухолевого процесса и состоянием органов брюшной полости. С. С. Слесаренко и соавт. [13], R. Konno и соавт. [14] считают злокачественный характер опухоли принципиальным противопоказанием к выполнению лапароскопических операций, объясняя это несоответствием лапароскопических технологий концепции онкохирургии. По мнению других авторов, противопоказанием служат метастатическое поражение отдаленных органов, местное распространение опухоли на соседние органы, большие размеры удаляемой опухоли, перфорация кишки и перитонит, перифокальный воспалительный процесс и внутренние и наружные кишечные свищи, первично-множественное синхронное поражение или вовлечение анального канала при КРР, а также большой объем удаляемого органа, наружные вегетации опухоли и большое количество измененных лимфатических узлов. Необходимо отметить, что подобные положения не разделяют многие современные авторы.

Важным является определение возможности проведения лапароскопических вмешательств у пациентов, ранее перенесших открытые операции на органах брюшной полости. Ряд авторов считают наличие лапаротомии в анамнезе противопоказанием к эндовидеохирургическим операциям у данных больных. H. F. Welter [15] и

J. B. De Meeus [16] относят к противопоказаниям только наличие значительного спаечного процесса. Другие работы демонстрируют, что предшествующие операции на органах брюшной полости не относятся к абсолютным противопоказаниям к лапароскопическим вмешательствам. A. Sasaki и соавт. [17] опровергают мнение о невозможности выполнения лапароскопических вмешательств у пациентов, ранее перенесших травматичные полостные операции.

Таким образом, ряд авторов доказали техническую возможность выполнения лапароскопических операций у онкологических больных, перенесших ранее лапаротомные операции на органах брюшной полости. Постоянное совершенствование технического оснащения, повышение квалификации и растущий опыт обеспечивают условия для расширения показаний к проведению эндовидеохирургических операций у больных с онкологической патологией.

Существует мнение о невозможности выполнения адекватной лапароскопической ревизии органов брюшной полости по причине отсутствия тактильных ощущений, не позволяющих адекватно оценить распространенность опухолевого процесса, что ухудшает радикальность выполненной операции. Однако современные методы диагностики (магнитно-резонансная томография с применением технологии диффузионно-взвешенных изображений, мультиспиральная компьютерная томография, позитронно-эмиссионная томография, совмещенная с компьютерной томографией, интраоперационная сонография и др.) дают возможность оценить распространенность опухолевого процесса, наличие метастазов в региональных лимфатических узлах, а следовательно, нивелировать недостатки, связанные с отсутствием тактильных ощущений при эндовидеохирургии. Таким образом, отсутствие возможности прямой интраоперационной пальпации не является противопоказанием к проведению лапароскопических вмешательств у онкологических больных благодаря наличию альтернативных способов достоверной оценки распространенности опухолевого процесса.

Среди вопросов использования лапароскопической технологии в колопроктологии наибольшее число дискуссий вызывает радикальное лечение злокачественных новообразований прямой кишки. В 1995 г., по данным S. Wexner, 50% из 1520 членов Американской ассоциации колоректальных хирургов применяют лапароскопические операции при КРР. При этом 78% из них выполняют правостороннюю и 57% — левостороннюю гемиколэктомию, 44% — переднюю резекцию прямой кишки, 42% — реконструктивно-восстановительные вмешательства после ранее перенесенной операции Гартмана, 52% хирургов осуществляют лапароскопическое формирование колостомы и лишь 27% — экстирпацию прямой кишки [18].

Основными принципами радикальных лапароскопических операций при КРР, по мнению J. Milsom и S. Kim, являются высокая перевязка питающего сосуда, широкая резекция сегмента кишки с брыжейкой и окружающей клетчаткой; диссекция региональных лимфатических узлов по ходу питающих сосудов и брыжейки; максимально бережное обращение с опухолью. При этом, по

мнению авторов, при мобилизации кишки с опухолью желательнее закрыть ее просвет выше и ниже опухоли; удаление резецированного сегмента кишки должно производиться в герметичном пластиковом контейнере; перед выполнением операции необходима тщательная ревизия органов брюшной полости [19].

Большое количество научных дискуссий и экспериментальных исследований, обсуждение их результатов посвящены проблеме развития имплантационных троакарных метастазов у пациентов, перенесших лапароскопические операции по поводу КРР. Эта проблема достаточно серьезна и беспокоит не только противников, но и приверженцев лапароскопической хирургии. Подобные осложнения описаны после онкологических операций по поводу КРР, вмешательств на органах гепатопанкреато-билиарной зоны, опухолей желудка.

Основная гипотеза возникновения троакарных метастазов связана с диссеминацией опухолевых клеток в результате пневмоперитонеума. С. Jingle и соавт. [20] изучили возможные механизмы распространения опухолевых клеток при лапароскопических и традиционных вмешательствах по поводу КРР. У 36 пациентов в ходе лапароскопических вмешательств и у 45 при традиционных операциях выполнялся перитонеальный лаваж 100 мл изотонического раствора натрия хлорида. Инструменты также промывали 100 мл изотонического раствора натрия хлорида. Помимо этого углекислый газ, использовавшийся для карбоксиперитонеума, фильтровали через аналогичное количество изотонического раствора натрия хлорида. При тщательном цитологическом исследовании полученной жидкости опухолевые клетки не были обнаружены в изотоническом растворе натрия хлорида, использованном для фильтрации углекислого газа. Положительные результаты цитологического исследования получены в 2,78% случаев в смывах с хирургических инструментов и в 11,11% — в изотоническом растворе натрия хлорида, использованном для санации брюшной полости. Результаты были идентичны в обеих группах. Эти данные позволяют сделать вывод, что при использовании карбоксиперитонеума диссеминация опухолевых клеток не происходит, а при лапароскопических вмешательствах риск внутрибрюшного имплантационного метастазирования не выше, чем во время выполнения традиционных операций.

V. J. Halpin и соавт. [21] также исследовали влияние пневмоперитонеума на распространение опухолевых клеток. В своей работе авторы вводили колонию клеток КРР человека в большой сальник подопытных хомячков. Спустя 2 нед выполняли операции, заключающиеся в ведении двух 5-миллиметровых троакаров, деструкции и удалении опухоли без соблюдения онкологических принципов. У одной группы животных после операции поддерживался пневмоперитонеум. Частота возникновения метастазов в точках введения троакаров при наложении длительного пневмоперитонеума составила 9%, при краткосрочном пневмоперитонеуме — 10%. Эти результаты позволили сделать авторам вывод, что имплантация опухолевых клеток в зонах введения троакаров происходит не по причине пневмоперитонеума, а в результате несоблюдения онкологических принципов и деструкции опухоли в ходе хирургических вмешательств.

Результаты отечественных исследований, проведенных в Государственном научном центре колопроктологии, свидетельствуют о том, что риск переноса злокачественных клеток по брюшной полости возможен как при лапароскопических, так и при открытых операциях лишь при наличии местнораспространенных новообразований. По данным Регистра лапароскопических операций на кишечнике, в группе прослеженных больных ($n = 451$), перенесших лапароскопические операции по поводу рака толстой кишки, рецидивы в области лапаротомных разрезов возникли у 5 (1,1%): у 3 в области введения троакаров и у 2 в области минилапаротомного разреза. Подобные сообщения являются причиной ряда как клинических, так и экспериментальных исследований.

Y. C. Liang и соавт. [22] провели сравнительный метаанализ результатов лечения КРР у 2474 пациентов, оперированных лапароскопическим и открытым способами. Статистически значимых различий частоты имплантационного метастазирования в места введения троакаров и операционную рану не отмечено.

N. Miyajima и соавт. [23] приводят результаты 1057 лапароскопических вмешательств по поводу КРР. Развитие метастазов в области введения троакаров авторы не отметили ни в одном случае.

P. P. Mehta и соавт. [24] оценивали долгосрочные результаты у 110 пациентов, перенесших лапароскопические ассистированные вмешательства по поводу КРР, при этом не отметили метастазов в области установки троакаров ни в одном случае.

J. Leroу и соавт. [25] приводят результаты 102 мезоректумэктомий без троакарных метастазов.

В своих исследованиях M. E. Franklin и соавт. [26] разработали основные принципы профилактики троакарных метастазов, которые считают обязательными. На первом этапе операции должна выполняться перевязка питающего сосуда, затем мобилизация кишки вместе с прилегающей жировой клетчаткой единым блоком. Авторы советуют выполнять интраоперационную колоноскопию для более точного определения дистального края резекции. Лапароскопическую лимфодиссекцию необходимо выполнять в полном объеме, как и при классических (открытых) операциях. Удаление органа из брюшной полости должно выполняться в специальных пластиковых контейнерах, чтобы предотвратить развитие имплантационных метастазов. Их применение в 100 операциях, выполненных по поводу КРР, позволило предупредить возникновение троакарных метастазов.

Таким образом, на основании как экспериментальных, так и клинических исследований можно сделать вывод, что развитие имплантационных метастазов в точках введения троакаров является редким осложнением, сопоставимым по частоте с развитием метастатического поражения операционной раны после традиционных вмешательств. Пневмоперитонеум не приводит к дополнительной диссеминации опухолевых клеток, причиной которой, наиболее вероятно, является несоблюдение онкологических принципов в ходе хирургических вмешательств.

Актуальной проблемой лапароскопической хирургии в онкологии является определение принципиальной возможности выполнения радикальных операций, критери-

ями оценки которых служат отдаленные результаты лечения. Еще недавно в мировой литературе не было работ, оценивающих эти показатели. Некоторые авторы предполагали, что отдаленные результаты у пациентов, оперированных лапароскопическим доступом, будут лучше результатов традиционных операций. Существует ряд публикаций, посвященных непосредственным результатам эндовидеохирургических операций у онкологических больных, характеризующих их как сопоставимые или превосходящие по результатам традиционные операции. К. А. Vilimoga и соавт. [27] подчеркивали значительно более высокое качество жизни у таких пациентов.

В последние годы проведено множество исследований, основной задачей которых была оценка отдаленных результатов лапароскопических вмешательств по онкологическим позициям. Большинство этих работ посвящено лечению рака ободочной и прямой кишки. Р. Р. Mehta и соавт. [24] провели анализ отдаленных результатов лечения 110 пациентов, перенесших лапароскопические операции по поводу рака толстой кишки. Послеоперационная летальность составила по данным авторов 2,77%, конверсия выполнена в 12% случаев, десятилетняя выживаемость при I стадии ставила 78%, при II стадии — 33%, при III стадии — 30%, при IV стадии — 0. Таким образом, авторы продемонстрировали, что эндовидеохирургические вмешательства по поводу КРР являются безопасными и технически выполнимыми, а отдаленные результаты лечения сопоставимы с результатами традиционных хирургических вмешательств.

J. Leroy и соавт. [25] опубликовали результаты 102 мезоректумэктомий, из которых 99 были выполнены полностью лапароскопическим доступом, 90 — в радикальном объеме. Пятилетняя выживаемость в группе лапароскопических операций составила 65%, а медиана продолжительности жизни — 6,23 года, что сопоставимо с аналогичными показателями при лапаротомных вмешательствах при аналогичной распространенности опухолевого процесса. В. Vohm и соавт. [28] выполнили радикальные лапароскопические операции по поводу КРР у 55 пациентов, медиана продолжительности жизни которых составила 27 мес (от 9 до 45 мес). Рецидивы заболевания отмечены у 2 (1,1%) пациентов. Авторы считают данную продолжительность наблюдений недостаточной для получения достоверных результатов, но отмечают тенденцию к низкой частоте рецидивов после лапароскопических операций по поводу КРР.

Несмотря на удовлетворительные показатели приведенных выше исследований, в онкологии научный вес имеют отдаленные результаты многоцентровых рандомизированных контролируемых исследований (РКИ). Результаты первого метаанализа пятилетней выживаемости у 6500 пациентов, перенесших лапароскопические вмешательства по поводу КРР, были опубликованы в конце 2008 г. Е. Kuhny и соавт. [29]. В работе проанализированы результаты 12 РКИ (Curet — 2000; CLASSIC — 2005; Hasegawa — 2003; Leung — 2004; Liang — 2007; Milsom — 1998; Stage — 1997; Lacy — 2002; Weeks — 2002; Veldkamp — 2005) по оценке эффективности лапароскопических и традиционных операций. По итогам метаанализа никакие статистически значимые различия по частоте рецидивов, метастазам, количеству удаляемых

лимфатических узлов и хирургическим краям резекции не получены. Частота рецидива при раке ободочной кишки составила 5,2% для лапароскопических и 5,6% для лапаротомных операций, а при прямой кишке — 7,2 и 7,7% соответственно. Соблюдение онкологических принципов при использовании лапароскопических технологий является весьма важным. Без учета этих показателей все преимущества лапароскопических вмешательств были малозначимы.

Современные европейские и американские многоцентровые РКИ продемонстрировали высокую эффективность и отсутствие различий по непосредственным и отдаленным результатам между лапароскопической и открытой хирургией. Это в свою очередь привело к популяризации и широкому внедрению эндовидеохирургии в программу лечения КРР. Тем не менее «золотым стандартом» продолжает оставаться открытая хирургическая техника с широкой лапаротомией, высокой перевязкой питающего сосуда и лимфодиссекцией. Эти фундаментальные основы обязательно должны быть соблюдены при выполнении лапароскопических операций и не должны идти в ущерб результатам ради стремления снизить травматичность операционного доступа, уменьшить послеоперационный болевой синдром и других преимуществ малоинвазивных вмешательств.

Авторы некоторых РКИ, сравнивающих лапароскопическую и открытую хирургию при КРР, пытаются установить, возможно ли соблюдение всех онкологических стандартов при выполнении эндовидеохирургических вмешательств. В них оценивают течение раннего послеоперационного периода (30 дней), непосредственные и отдаленные результаты лечения. К ранним послеоперационным осложнениям относят смерть, количество гнойных осложнений в области операционной раны, процент несостоятельности анастомозов, количество повторных операций, кровотечения. Оценка непосредственных результатов лечения включает длительность операции, интраоперационную кровопотерю, число дней пребывания в стационаре, сроки восстановления перистальтики и пассажа по кишечнику, объем удаленных лимфатических узлов, латеральный край резекции и др. К отдаленным результатам лечения относят частоту рецидивов заболевания, общую, скорректированную, безрецидивную выживаемость. Итоги 8 крупных РКИ (Liang — 2007; CLASSIC — 2005; Braga — 2005; Braga — 2007; COST — 2004; Leung — 2004; Lacy — 2002; Curet — 2000) продемонстрировали отсутствие различий по общей, безрецидивной и скорректированной выживаемости, частоте рецидивов, количеству метастазов в области введения троакаров. В исследовании Lacy получено улучшение этих показателей после лапароскопических операций у пациентов с III стадией КРР. При анализе ранних послеоперационных осложнений все существующие РКИ (Liang — 2007; COLOR — 2004, 2005; CLASSIC — 2005; Braga — 2005, 2007; COST — 2004; Zhou — 2004; Leung — 2004; Hasegawa — 2003; Winslow — 2002; Lacy — 2002; Curet — 2000; Milsom — 1998; Schwenk — 1998; Stage — 1997) показали отсутствие статистически достоверных различий между лапароскопической и открытой хирургией. Частота конверсий варьировала от 4,2 до 29% [30—33].

В этих работах была также изучена продолжительность пребывания больных в стационаре после хирургического лечения. После лапароскопических вмешательств средняя продолжительность пребывания больных в стационаре составила 5—9 дней, а после открытых — 6—13 дней (в зависимости от исследования). При оценке качества течения раннего послеоперационного периода (продолжительность применения энтеральных и парентеральных анальгетиков, сроки восстановления перистальтики и пассажа по кишке, начало энтерального питания, восстановление показателей вентиляции легких) также выявлено уверенное преимущество эндовидеохирургических технологий. Объем кровопотери был значительно меньше во время лапароскопических операций.

Следует отметить, что единственным показателем, существенно отличающимся от открытой хирургической техники, является продолжительность операции; в среднем лапароскопические вмешательства увеличивают его на 24—83 мин.

Одними из важных показателей радикальности выполненной операции являются границы резекции и количество удаленных лимфатических узлов, что существенно влияет на прогноз заболевания. Если проблема взаимоотношения границ резекции и опухолевого очага представляется понятной, так как при лапароскопической операции не происходит уменьшения объемов резекции, то вопрос о принципиальной возможности выполнения адекватной лапароскопической лимфодиссекции является актуальным и послужил поводом для проведения целого ряда исследований.

В. М. Venway и соавт. [34] в эксперименте на животных сравнивали результаты забрюшинной лимфаденэктомии после лапароскопических и лапаротомных вмешательств. Количество удаленных лимфатических узлов было сопоставимо в обеих группах. Ряд авторов, проанализировав результаты лапароскопической лимфаденэктомии при онкологических вмешательствах на органах брюшной полости, считают их безопасными и минимально травматичными. Так, по мнению К. В. Пучкова и соавт. (2003), лапароскопическая аортоподвздошная лимфодиссекция при верхнеампулярном раке прямой кишки позволяет минимизировать интраоперационную кровопотерю, сократить сроки реабилитации, а также снизить частоту тяжелых послеоперационных осложнений [35]. В. П. Сажин и соавт. отмечают, что по сравнению с открытыми технологиями хирургического лечения рака прямой кишки лапароскопическая прецизионная техника улучшает качество визуализации лимфатических узлов, более удобна для манипуляций в узких пространствах малого таза, менее травматична и способствует снижению частоты развития интра- и послеоперационных осложнений, сокращению сроков реабилитации больных [36].

Таким образом, по результатам целого ряда исследований, оценивающих эффективность эндовидеохирургического метода лимфодиссекции при злокачественных новообразованиях различной локализации, не выявлено различий по эффективности данного метода по сравнению с традиционным. Накопленный опыт свидетельствует, что лапароскопическая лимфодиссекция не снижает

радикальности вмешательств и может служить хорошей альтернативой открытому методу в связи с меньшей травматичностью.

В последнее время появляется все больше работ, демонстрирующих возможность внедрения лапароскопических методов при лечении как диссеминированного, так и местнораспространенного КРР. Так, по мнению Y. Miyamoto [37], лапароскопическая резекция первичной опухоли при генерализованном раке является возможной и безопасной, а D. C. Ng и соавт. считают, что местное распространение опухолевого процесса на соседние органы (T4) не служит противопоказанием к эндовидеохирургическим вмешательствам при соблюдении ряда условий: подготовленной бригаде хирургов, достаточном техническом оснащении операционной [38].

Обобщая изложенное, можно констатировать, что продемонстрировано отсутствие значимых различий по основным хирургическим и онкологическим показателям между лапароскопическим и традиционным (лапаротомным) доступом, обусловленное сохранением объемов резекции пораженного органа, возможностью проведения адекватной интраоперационной ревизии и лапароскопической лимфодиссекции, а также отсутствием дополнительной диссеминации опухолевых клеток в ходе выполнения лапароскопических операций. Немаловажно и отсутствие различий по отдаленным результатам как следствие соблюдения принципов онкологического радикализма при малоинвазивных эндовидеохирургических вмешательствах. Развитие лапароскопической техники, квалифицированная подготовка бригад хирургов и адекватное материально-техническое обеспечение операционных позволяют расширить показания к выполнению лапароскопических вмешательств при различных онкологических заболеваниях, в том числе у больных с запущенными стадиями процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jacobs M., Verdeja J. C., Goldstein H. S. Minimally invasion colon resection (laparoscopic colectomy) // Surg. Laparosc. Endosc. — 1991. — Vol. 1, N 3. — P. 144—150.
2. Sequential psychomotor skills development in laparoscopic colon surgery / Geis W. P., Coletta A. V., Verdeja J. C., Plasencia G., Ojogho O., Jacobs M. // Arch. Surg. — 1994. — Vol. 129, N 2. — P. 206—212.
3. Александров В. Б. Лапароскопические технологии в колоректальной хирургии. — М.: Медпрактика-М, 2003.
4. Иллюстрированное руководство по эндоскопической хирургии: Учебное пособие для врачей-хирургов / С. И. Емельянов (ред.). — М.: МИА, 2004. — 217 с.
5. Tomita H., Marcello P. W., Milsom J. W. Laparoscopic surgery of the colon and rectum // World. J. Surg. — 1999. — Vol. 23. — P. 397—405.
6. Fuhrmann G. M., Ota D. M. Laparoscopic intestinal stomas // Dis. Colon. Rectum. — 1994. — Vol. 37. — P. 444—447.
7. Lyeriy H. K., Mault J. R. Laparoscopic ileostomy and colostomy // Ann. Surg. — 1994. — Vol. 279. — P. 317—322.
8. American Society of Colon and Rectal Surgeons. Approved statement on laparoscopic colectomy // Dis. Colon Rectum. — 1994. — Vol. 37. — P. 8—12.
9. Value of laparoscopic technique in primary colorectal carcinoma / Böhm B., Schwenk W., Gründel K., Junghans T., Müller J. M. // Chirurg. — 1997. — Vol. 68, N 3. — P. 231—236.
10. Laparoscopic resection of colon cancer: consensus of the European Association of Endoscopic Surgery (EAES) / Veldkamp R., Gholghesaei M., Bonjer H. J., Meijer D. W., Buunen M., Jeekel J., Anderberg B., Cuesta M. A., Cuschieri A., Fingerhut A., Fleshman J. W., Guillou P. J., Haglund E., Himpens J., Jacobi C. A., Jakimowicz J., Koeckerling F.,

Lacy A. M., Lezoche E., Monson J. R., Morino M., Neugebauer E., Wexner S. D., Whelan R. L. // *Surg. Endosc.* — 2004. — Vol. 18, N 8. — P. 1163—1185.

11. Cancer and laparoscopy, experimental studies: a review / Canis M., Bothehorishvili R., Wattiez A., Pouly J. L., Mage G., Manhes H., Bruhat M. A. // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Boil.* — 2000. — Vol. 91, N 1. — P. 1—9.

12. Redefining contraindications to laparoscopic colorectal resection for high-risk patients / Marks J. H., Kawun U. B., Hamdan W., Marks G. // *Surg. Endosc.* — 2008. — Vol. 22, N 8. — P. 1899—1904.

13. О некоторых опасных тенденциях развития малоинвазивной видеондоскопической хирургии / Слесаренко С. С., Коссович М. А., Бирюков А. Ю., Агапов В. В. // *Эндоскоп. хир.* — 1997. — № 1. — С. 98—99.

14. Indications for laparoscopic surgery of ovarian tumors / Konno R., Nagase S., Sato S., Fukaya T., Yajima A. // *Tohoku J. Exp. Med.* — 1996. — Vol. 178, N 3. — P. 225—231.

15. Welter L. C., Gleissner J. Laparoscopic resection of the colon // *M.M.W. Fortschr. Med.* — 2006. — Vol. 148, N 14. — P. 44—45.

16. De Meeus J. B., Magnin G. Indications of laparoscopic hysterectomy // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* — 1997. — Vol. 74, N 1. — P. 49—52.

17. Laparoscopic cholecystectomy in patients with a history of gastrectomy / Sasaki A., Nakajima J., Nitta H., Obuchi T., Baba S., Wakabayashi G. // *Surg. Today.* — 2008. — Vol. 38, N 9. — P. 790—794.

18. Laparoscopic colorectal surgery: are we being honest with our patients? / Wexner S. D., Cohen S. M., Ulrich A., Reissman P. // *Dis. Colon. Rectum.* — 1995. — Vol. 38. — P. 723—726.

19. Milsom J. W., Kim S. H. Laparoscopic versus open surgery for colorectal cancer // *World J. Surg.* — 1997. — Vol. 27. — P. 702—705.

20. Jingle C., Rong C., Rubai X. Influence of colorectal laparoscopic surgery on dissemination and seeding of tumor cells // *Surg. Endosc.* — 2006. — Vol. 20, N 11. — P. 1759—1761.

21. Halpin V. J., Underwood R. A., Ye D., Cooper D. H., Wright M., Hickerson S. M., Connett W. C., Connett J. M., Fleshman J. W. / Pneumoperitoneum does not influence trocar site implantation during tumor manipulation in solid tumor model // *Surg. Endosc.* — 2005. — Vol. 19, N 12. — P. 1636—1640.

22. Liang Y. C., Li G. X., Chen P. Y. Laparoscopic versus conventional open resection for colorectal cancer: a meta-analysis on recurrence // *Zhonghua. Wei. Chang. Wai. Ke. Za. Zhi.* — 2008. — Vol. 11, N 5. — P. 414—420.

23. Results of a multicenter study of 1057 cases of rectal cancer treated by laparoscopic surgery / Miyajima N., Fukunaga M., Hasugawa H., Tanaka J., Okuda J., Watanabe M. // *Surg. Endosc.* — 2009. — Vol. 23, N 1. — P. 113—118.

24. Laparoscopic — assisted colon resections: long-term results and survival / Mehta P. P., Griffin J., Ganta S., Rangraj M., Steichen F. // *JSLs.* — 2005. — Vol. 9, N 2. — P. 184—188.

25. Leroy J., Jamali F., Forbes L. Laparoscopic total mesorectal excision (TME) for rectal cancer surgery: long-term outcomes // *Surg. En-*

dosc. — 2004. — Vol. 18, N 2. — P. 281—289.

26. Prospective comparison of open vs. laparoscopic colon surgery for carcinoma. Five-year results / Franclin M. E., Rosenthal D., Abrego-Medina D., Dorman J. P., Glass J. L., Norem R., Diaz A. // *Dis. Colon Rectum.* — 1996. — Vol. 39. — P. 35—46.

27. Use and outcomes of laparoscopic-assisted colectomy for cancer in the United State / Bilimoria K. Y., Bentrem D. J., Nelson H., Stryker S. J., Stewart A. K., Soper N. J., Russell T. R., Ko C. Y. // *Arch. Surg.* — 2008. — Vol. 143, N 9. — P. 832—839.

28. Böhm B., Schwenk W., Muller J. M. Long-term results after laparoscopic resection of colorectal carcinoma // *Chirurg.* — 1999. — Vol. 70, N 4. — P. 453—455.

29. Long-term results of laparoscopic colorectal cancer resection / Kuhry E., Schwenk W., Gaupset R., Romild U., Bonjer H. J. // *Cochrane Database of Systematic Reviews 2008, Issue 2. Art. No.: CD003432. DOI: 10.1002/14651858.CD003432.pub2.*

30. Short-term endpoints of conventional versus laparoscopic-assisted surgery in patients with colorectal cancer (MRC CLASSIC trial): multicenter, randomized controlled trial / Guillou P. J., Quirke P., Thorpe H., Walker J., Jayne D.G. // *Lancet.* — 2005. — Vol. 365, N 9472. — P. 1718—1726.

31. Randomized controlled trial of laparoscopic versus open colectomy for advanced colorectal cancer / Hasegawa H., Kabeshima Y., Watanabe M., Yamamoto S., Kitajima M. // *Surg. Endosc.* — 2003. — Vol. 17, N 4. — P. 636—640.

32. Laparoscopy-assisted colectomy versus open colectomy for treatment of non-metastatic colon cancer: a randomized trial / Lacy A. M., Garcia-Valdecasas J. C., Delgado S., Castells A., Taura P., Pique J. M., Visa J. // *Lancet.* — 2002. — Vol. 359. — P. 2224—2229.

33. The Clinical Outcomes of Surgical Therapy Study Group. A comparison of laparoscopically assisted and open colectomy for colon cancer // *N. Engl. J. Med.* — 2004. — Vol. 350, N 20. — P. 2050—2059.

34. Open versus Laparoscopic retoperitoneal lymph node dissection: assessing adequacy of dissection in a Porcine model / Benway B. M., Diaz D. L., Katz M. D., Vardi I. Y., Chavla N. T., Desai A. C., Badwan K. H., Maxwell K. L., Baca G., Humphrey P. A., Bhayani S. B., Figenshau R. S. // *J. Endourol.* — 2009. — Vol. 23, N 3. — P. 485—488.

35. Пучков К. В., Хубезов Д. А. Лапароскопическая аортоподвздошная лимфодиссекция при верхнеампулярном раке прямой кишки // *Эндоскоп. хир.* — 2003. — Приложение. — С. 108.

36. Сажин В. П., Авдовенко А. Л., Юрищев В. А. Лапароскопическая лимфодиссекция при раке прямой кишки // *Эндоскоп. хир.* — 2003. — Приложение. — С. 132.

37. Miyamoto Y. Laparoscopic resection of primary tumor for stage IV colorectal cancer // *Proceedings of the 19th International congress of the EAES, 2011.* — Abs. 0133.

38. The outcome of laparoscopic colorectal resection in T4 cancer / Ng D. C., Co C. S., Cheung H. Y., Chung C. C., Li M. K. // *Colorectal Dis.* — 2011. — Vol. 13, N 10. — P. 349—352.

Поступила 16.03.2012

*Andrey Olegovich Atroschenko¹, Igor Evgenievich Khatkov²,
Yuriy Andreyevich Barsukov³, Viacheslav Afandiyevich Aliev⁴,
Dmitriy Vladimirovich Kuzmichev⁵, Rasim Ilkhamovich Tamrazov⁶,
Pavel Stanislavovich Tyutyunnik⁷*

MAIN MILESTONES OF LAPAROSCOPIC SURGERY IN CANCER COLOPROCTOLOGY

¹ MD, Postgraduate Student, Chair of Faculty Surgery No. 2, Moscow State Medical Dentistry University
(20/1, Delegatskaya ul., Moscow, RF, 127473)

² MD, PhD, DSc, Professor, Head, Chair of Faculty Surgery No. 2, Moscow State Medical Dentistry University
(20/1, Delegatskaya ul., Moscow, RF, 127473)

³ MD, PhD, DSc, Professor, Head, Proctology Department, Clinical Oncology Research Institute,
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁴ MD, PhD, Senior Researcher, Proctology Department, Clinical Oncology Research Institute,
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁵ MD, PhD, Researcher, Proctology Department, Clinical Oncology Research Institute,
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁶ MD, PhD, Senior Researcher, Proctology Department, Clinical Oncology Research Institute,
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁷ MD, Postgraduate Student, Chair of Faculty Surgery No. 2, Moscow State Medical Dentistry University
(20/1, Delegatskaya ul., Moscow, RF, 127473)

Address for correspondence: Atroschenko Andrey Olegovich, Proctology Department,
Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS,
24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478; e-mail: dr.atroschenko@gmail.com

The paper describes in detail the history of laparoscopic surgery in proctology. Basing on a vast analysis of the literature the author demonstrates feasibility and great importance of low invasive procedures in various areas of surgery. Results of clinical trials prove reasonable laparoscopic operations in cancer proctology provided mandatory compliance with basic principles of cancer surgery (high vessel ligation, adequate lymph node dissection, adherence to the 'don't touch' rule) is ensured. This concept makes optimistic the prospects for further improvement in treatment outcomes by ensuring early social and labor rehabilitation for this very serious category of colorectal cancer patients.

Key words: laparoscopic surgery, oncology, cancer proctology, colorectal cancer.

Геннадий Альтерович Белицкий¹, Марианна Геннадиевна Якубовская²

ИНФЕКЦИОННЫЕ КЛОНЫ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК (К 135-ЛЕТИЮ ПЕРВОЙ ПЕРЕВИВКИ ОПУХОЛИ М. А. НОВИНСКИМ И 110-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ Л. М. ШАБАДА)

¹ Д. м. н., профессор, ведущий научный сотрудник, отдел химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

² Д. м. н., руководитель, отдел химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

Адрес для переписки: 115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24,
НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН, отдел химического канцерогенеза,
Белицкий Геннадий Альтерович; e-mail: belitsga@gmail.com

В обзоре изложены современные данные о заражении животных и человека клетками злокачественных опухолей. Приведены результаты изучения инфекционной венерической саркомы собак, эпизоотии злокачественной шванномы в популяции тасманийского дьявола — хищного сумчатого млекопитающего, обитающего в Тасмании и Австралии, а также трансмиссивной ретикулосаркомы хомяков. Изложены данные экспериментов по перевивке линий злокачественных клеток человека добровольцам, а также заражения злокачественной опухолью в результате травмы при экспериментах с клетками опухоли или во время хирургической операции. Обсуждаются условия и механизмы трансмиссии опухолевых клеток у животных и человека.

Ключевые слова: М. А. Новинский, Л. М. Шабда, трансмиссия опухоли, венерическая саркома собак, опухоль тасманийского дьявола, ретикулосаркома.

Сталкиваясь с чем-то неизвестным, чему нет аналогий в наших знаниях, мы бредем теми же путями, что и наши предки, поскольку алгоритм движения от известного к неизвестному как одна из функций психики человека не претерпел особых изменений со времен зарождения науки. Поэтому нет оснований снисходительно смотреть с высоты современных знаний на попытки наших предшественников решить задачу трансплантации опухолей.

Не зная законов гистосовместимости, механизма иммунных реакций хозяина против трансплантата и трансплантата против хозяина, многие врачи, а в их числе и известные исследователи, безуспешно пытались перевить опухоль человека животным, а также от животных животным того же или другого вида. В 50-е годы XIX века много экспериментов по перевивке опухолей в различных вариациях произвели известные хирурги Дюпоитрен и Альбер. Профессор Бильрот — корифей полостной хирургии, оставивший коллегам две используемые до настоящего времени операции на желудке, также отдал много усилий этой проблеме, но безуспешно [1]. В связи с этим следует отдать дань великого уважения ветеринарному врачу Мстиславу Александровичу Новинскому (рис. 1), который 135 лет назад в Медико-хирургической академии Санкт-Петербурга впервые



Рисунок 1. Магистр ветеринарных наук М. А. Новинский (1841—1914), впервые осуществивший серию успешных перевивок опухолей.

успешно перевил венерическую саркому собак и сделал несколько последовательных пассажей этой опухоли, показав, что она переносится только живыми клетками, но не экстрактами и не фильтратами. Первое сообщение о результатах его опытов было опубликовано на русском и немецком языках в 1876 г., а годом позже он защитил на эту тему диссертацию на соискание степени магистра ветеринарных наук под руководством профессоров В. Е. Воронцова и М. М. Руднева, которые давно занимались этой проблемой [2; 3].

Перевиваемая венерическая саркома собак более четверти века оставалась единственной воспроизводимой моделью трансплантации опухолевых клеток, поскольку перевиваемая опухоль Эрлиха была получена из клеток рака молочной железы мыши только в 1905 г., а перевиваемая на крысах саркома Йенсена — в 1907 г.

В науке новое находят почти так же быстро, как и забывают старое, особенно имена тех, кто трудом своей жизни это «старое» добыл.

Имя М. А. Новинского и его приоритетная работа были извлечены из небытия академиком АМН СССР, профессором Львом Манусовичем Шабодом, 110 лет со дня рождения которого исполнилось 19 января 2012 г. (рис. 2). С 1958 г. и до конца жизни Л. М. Шабод был одним из ведущих ученых Онкологического научного центра, причем ряд лет в должности заместителя директора академика Н. Н. Блохина.

Обстоятельства, при которых Л. М. Шабод сделал эту работу, потребовавшую массу кропотливого труда, сделавшего бы честь любому детективу, были более чем сложными. В конце 40-х годов XX века его лаборатория оказалась на грани закрытия. Л. М. Шабод был лишен возможности заниматься экспериментальной работой в полную силу, но и в этих условиях нашел нужное дело, до которого раньше не доходили руки, и сделал его. Он



Рисунок 2. Основоположник экспериментальной онкологии в СССР академик АМН СССР Л. М. Шабод (1902—1982).

нашел все материалы о М. А. Новинском, включая его диссертацию и даже фотографию. Была написана книга «Новинский — родоначальник экспериментальной онкологии», которая вышла в серии «Научные биографии» в 1950 г.

Жизнь М. А. Новинского была типична для многих ученых во все времена. Сын сельского священника, он по желанию отца окончил духовное училище, а потом и семинарию. Однако спустя 3 года сложил с себя духовный сан и в 1870 г. поступил на ветеринарное отделение Медико-хирургической академии Санкт-Петербурга.

Через 4 года в возрасте 33 лет М. А. Новинский получил звание ветеринарного врача. При этом ему, как «оказавшему отличные успехи в науках», был выдан диплом с отличием с правом на двухлетнее усовершенствование при Академии. За 2 года М. А. Новинский выполнил на золотую медаль работу о роли нервов в заживлении ран и диссертацию «К вопросу о прививании злокачественных новообразований (экспериментальное исследование)», которая состояла из 36 страниц с двумя рисунками. Защита происходила на Ученом совете, членами которого были такие классики, как терапевты С. П. Боткин и В. А. Манассеин, хирург Н. В. Склифосовский, патологоанатом М. М. Руднев, анатом В. Д. Грубер, химик и композитор А. П. Бородин и гистолог О. Н. Заварыкин.

Защита прошла блестяще. Казалось бы, Новинскому открывался путь в науку, тем более что Ученый совет ходатайствовал о командировании его за границу, после чего он вошел бы в число руководителей Медико-хирургической академии. Но, как это бывало во все времена, всемогущая бюрократия в лице Главного военно-медицинского управления на ходатайство Ученого совет отписала: «М. А. Новинский не может быть в настоящее время командирован за границу с ученой целью, так как суммы по §5 статьи 2 сметы Главного военно-медицинского управления 1880 г. по теперешнему низкому курсу рубля за границей едва будет достаточно для 4 лиц и такие лица уже имеются».

Вместо Германии Новинский был отправлен в казачий полк на должность ветеринарного врача.

Через полмесяца после отъезда Новинского в полк те же силы начали «Дело об упразднении ветеринарного отделения императорской Медико-хирургической академии». Так что, когда он отслужил положенное время и вернулся в Санкт-Петербург, этого отделения уже не было, а его научный руководитель и друг экстраординарный профессор В. Е. Воронцов был «отчислен за штат».

Все рухнуло. Новинскому дали работу ветеринара на скотопригонном дворе железной дороги. Прожил он почти 73 года и умер в 1914 г. от «грудной жабы», т. е. стенокардии, которой часто «награждаются» люди, чей труд остался невостребованным.

Изучение венерической саркомы собак продолжается и в настоящее время в связи с ее широким распространением и уникальными особенностями.

Эта опухоль была хорошо известна ветеринарам задолго до работ М. А. Новинского. Обычно она передается половым путем. Латентный период длится до 6 мес. После этого несколько недель опухоль интенсивно растет, иногда метастазирует в лимфатические узлы и паренхиматозные органы.

Спустя 3—9 мес в большинстве случаев наступает спонтанная регрессия опухоли, после которой развивается пожизненный иммунитет.

Сыворотка переболевшей собаки создает пассивный иммунитет у реципиента [4].

В эксперименте опухоль перевивается на собак любой породы, койотов, шакалов и лисиц, но только, как показал М. А. Новинский, живыми клетками.

Эта опухоль представляет собой наиболее древний моноклон [5; 6], который произошел из предшественника макрофагов. Его клетки экспрессируют характерный для мезодермальных тканей виментин, а также лизоцим, α_1 -антитрипсин и нейроспецифическую энолазу NSE. Кроме того, на его клетках может паразитировать *Leishmania infantum*, избирательно поражающая макрофаги. Кариотип опухоли одинаков у собак всех континентов. Несмотря на анеуплоидность, кариотип ее стабилен.

Расчет динамики дивергенции микросателлитов у собак позволил предположить, что венерическая саркома возникла от 250 до 2500 лет назад у волка или у собаки восточносибирского ареала.

Универсальным диагностическим маркером является наличие ретротранспозона LINE-1 в районе с-тус. Он мог появиться в ходе эволюции клона, но мог и присутствовать в половых клетках животного, у которого первоначально возник. Последняя возможность мало доказуема, поскольку инсерция ретротранспозона в этот locus половой клетки у современных собак не описана, а возможность доказать ее наличие у дикого предшественника исключена. Помимо экспрессии с-тус, пока нет данных об активации в этой опухоли других онкогенов или инактивации супрессоров.

Изучение гаплотипов наиболее полиморфной группы генов основного комплекса гистосовместимости собак DLA (dog locus antigen), включающей ген I класса DLA-88, а также три гена II класса DRB1, DQB1, DQA1, показало их идентичность во всех изученных опухолях. Ген *DRB1* имеет два аллеля — 04101 североамериканского волка и 04701 шакалов Аляски и Сибири, отличавшиеся друг от друга одной несинонимической заменой. В нормальных клетках собак аналогичные гаплотипы значительно разнятся в зависимости от породы и места обитания [7]. Анализ маркеров митохондриальной ДНК также подтвердил моноклональность венерической саркомы собак.

Генотипирование микросателлитов из ДНК хромосом различной локализации дало аналогичные результаты. Дивергенция по этому признаку в опухолевых клетках была минимальной по сравнению с нормальными клетками собак различной породы, у которых эти опухоли возникли. Единственный тип обмена между организмами носителей и опухолью состоял в захвате опухолевыми клетками нормальных митохондрий, которые, по-видимому, заменяли деградировавшие исходные [8].

На стадии прогрессирующего роста клетки опухоли секретируют цитокин — трансформирующий β -фактор роста 1-го типа (TGF- β 1), который ингибирует экспрессию основного комплекса гистосовместимости I и II классов, активность натуральных киллеров и цитотоксичность Т-лимфоцитов.

На этой же стадии опухоль секретирует фактор, токсичный для В-клеток, что ингибирует развитие гуморального иммунитета. По-видимому, эти свойства позволяют клону расти в аллогенном иммунокомпетентном организме до момента, когда он может быть перенесен на нового хозяина.

Регрессия опухоли связана с интерлейкином-6 (IL-6) и цитокином I типа — интерфероном- γ (IFN γ), которые продуцируются лимфоцитами, инфильтрирующими опухоль [7].

Венерическая саркома собак интересна в первую очередь своей способностью длительно расти в аллогенном организме, ингибируя действие основного комплекса гистосовместимости. Очевидно, что не все генетические и эпигенетические факторы, способствующие этому, выявлены к настоящему времени. Опухоль сохраняет при переносе на самые различные породы собак свою генетическую структуру, т. е. устойчива против соматической гибридизации с клетками хозяина, которая наблюдается при некоторых других опухолях [9].

Заслуживает внимания и то, что эта опухоль не прогрессирует в своей злокачественности, несмотря на бесчисленные пассажи. Возможно, что такой вариант отобрался из ряда более злокачественных клонов, быстро убивавших своих хозяев, и поэтому сохраняется так долго.

Все эти качества делают венерическую саркому собак объектом, заслуживающим тщательного изучения не только онкологами, но и трансплантологами.

В последние десятилетия выяснилось, что трансмиссивный соматический клон, вызывающий онкологическое заболевание, не уникален.

В Тасмании и Австралии обитает сумчатое плотоядное животное размером со среднюю собаку с латинским названием *Sarcophilus harrisi*, прозванное за свирепость тасманийским дьяволом.

Впервые опухоль тасманийского дьявола обнаружена в 1996 г. в популяции северо-восточной Тасмании, 60% которой она к настоящему моменту уничтожила. Опухоль локализуется на морде, шее и в ротовой полости, быстро растет, метастазирует в регионарные лимфатические узлы и висцеральные органы и убивает животное в течение 6—9 мес [7; 10—12].

Переносится при укусах во время драк за пищу или самок в период спаривания, притом минимальным количеством клеток, которые могут быть внесены в рану с зубов. По этому признаку она значительно более контагиозна, чем венерическая саркома собак, для перевивки которой требуется не менее 10^8 клеток.

Наблюдения над содержащимися в неволе животными показали, что они склонны к образованию эпителиальных опухолей, в частности карцином, но не злокачественных опухолей из соединительной ткани.

Трансмиссивный клон, вызвавший опустошительную эпизоотию, представляет собой мягкотканное новообразование, состоящее из недифференцированных округлых или веретеновидных клеток. Он возник из нейроэктодермы, в частности из малигнизированных предшественников шванновских клеток (леммоцитов), располагающихся вдоль аксонов периферических нервов и создающих их миелиновые оболочки [13].

Нормальные клетки тасманийского дьявола имеют 14 хромосом, включая половые. В опухоли их 13. Гаплотип идентичен во всех опухолях и всегда отличен от хозяина. Аллели микросателлитов и аллели докусов основного комплекса гистосовместимости во всех опухолях у всех животных идентичны, т. е. опухоль моноклональна.

В транскриптоме опухоли выражена экспрессия структурных генов миелина *MPZ*, *PRX*, *MBP* и *PMP22*. Маркеры эпителия, эндотелия и клеток гемопоэза не экспрессируются.

В опухоли обнаружены микроРНК *miR-21*, *miR-24* и *miR-19b*, повышенная экспрессия которых характерна для различных форм опухолевого роста, а также *miR-222*, наличие которой связано с инвазивностью опухоли. Экспрессия *miR-29b* и *miR-126*, которые рассматриваются как супрессоры опухолевого роста, выражена слабо [13].

Считается, что одной из причин массового распространения опухоли является относительная гомогенность популяции тасманийского дьявола, который эволюционировал на ограниченном пространстве, что создавало условия для инбридинга. Однако этим не могут быть полностью объяснены причины возникшей онкологической эпизоотии. Дело в том, что, несмотря на беспрепятственное распространение опухоли, здоровые и больные животные имеют полноценную систему иммунитета, как клеточного, так и гуморального, которые не позволяют нормальным клеткам одной особи преодолевать барьер гистосовместимости другой особи. В частности, аллогенные трансплантаты кожи отторгаются реципиентом в течение примерно 3 нед, причем наличие опухоли реакцию отторжения не ингибирует [14; 15].

Это породило надежду на то, что среди отловленных животных можно будет найти резистентные к опухоли особи и восстановить популяцию. С этой целью, а также для того, чтобы изучить возможность иммунизации, двум животным ввели облученные клетки опухоли, а через некоторое время и жизнеспособные. У одного самца опухоль привилась, у второго инокулированные клетки погибли на фоне выраженной иммунной реакции. К сожалению, после введения опухолевых клеток другой сублинии это животное тоже погибло [9].

Математическое моделирование эпизоотии позволило спрогнозировать полное уничтожение пораженной северо-восточной популяции в течение следующих 25—35 лет, однако анализ 10 микросателлитных маркеров ДНК показал, что через 2—3 поколения после начала распространения опухоли иммунологическая гетерогенность популяции в пораженных ареалах увеличилась, т. е., по-видимому, все-таки начал происходить отбор более резистентных особей. Кроме того, выяснилось, что юго-восточная популяция тасманийского дьявола, в которой эпизоотия не развилась, несколько отличается по основному комплексу гистосовместимости от пораженной северо-восточной [10].

Эти данные позволили сделать предположение о том, что в процессе эволюции при формировании видов трансмиссивные опухолевые клоны могли послужить одним из факторов отбора, обеспечившим дивергенцию главного комплекса гистосовместимости. По-видимому, такого рода клоны возникают время от времени в тесно

соприкасающихся гомогенных популяциях животных и существуют большее или меньшее время в зависимости от различных внешних факторов и степени злокачественности, которая определяет длительность жизни пораженной особи и вероятность заражения следующей.

Известна эпизоотия ретикулосаркомы, уничтожившая часть популяции хомяков в 60-е годы прошлого столетия. При этой форме заболевания опухолевые клетки появлялись в крови животных уже на 5-й день заболевания, а при финальном бластном кризе их количество превышало 100 000 в 1 мм³. Поскольку в этой местности в изобилии обитали комары *Aedes aegypti*, изучавшие эпизоотию зоологи предположили, что опухоль переносится кровососущими насекомыми. Экспериментально было показано, что в желудке комара опухолевые клетки сохраняют жизнеспособность в течение времени, достаточного, чтобы при укусе инфицировать здоровое животное, однако сам факт заражения укусом строго доказан не был [16].

Горизонтальный перенос опухоли у человека, т. е. заражение опухолевыми клетками, представляет собой большую редкость. Мы не имеем здесь в виду широко известные случаи переноса опухоли от донора органов или костного мозга с невыявленным онкологическим заболеванием реципиенту, который находился под действием иммунодепрессантов, предотвращающих отторжение как нормальной, так и опухолевой ткани. Мы не обсуждаем также случаи заражения лейкозом плода больной матерью или внутриутробного заражения одного плода другим.

Речь идет о здоровых людях, в организм которых по тем или иным причинам были внесены аллогенные опухолевые клетки. Начиная с XIX века, многие врачи, в частности известные дерматологи Альбер и Биетт, для решения вопроса о заразности злокачественных новообразований пытались привить опухоли себе. Во всех случаях дело кончалось воспалением и отторжением опухолевой ткани [1; 2].

Наиболее полная попытка изучения возможности трансплантации опухолей у человека была предпринята в 1956—1957 гг. в Sloan-Kettering Institute for Cancer Research [17; 18].

Здоровым добровольцам и больным с распространенными формами злокачественных опухолей, не получавшим на тот момент никаких химиопрепаратов или лучевого лечения, инъецировали под кожу предплечья $(0,5—1) \times 10^6$ опухолевых клеток человека из культуры ткани (табл. 1). С интервалом 1 нед в течение 8 нед исследовали биоптаты привитой ткани. У здоровых реципиентов клетки всех опухолевых линий полностью некротизировались в течение 2 нед, за исключением одного, у которого живые клетки линии НЕр3 определялись до 3-й недели, после чего некротизировались. Отторжение происходило при инфильтрации инокулята полиморфноядерными лейкоцитами, мононуклеарами и эозинофилами. Повторное введение тех же опухолевых клеток здоровым реципиентам приводило к более быстрому их отторжению.

У онкологических больных реакция отторжения была замедленной или отсутствовала. Активный рост привитой опухоли с наличием фигур митоза наблюдался у 20

Таблица 1

Гомотрансплантация злокачественных клеток человека [17]

Линия клеток ^а	Онкологические больные		Здоровые добровольцы	
	+ / всего ^б	длительность роста ^в , сут	+ / всего ^б	длительность роста ^в , сут
HeLa	2/3	14, 18	0/2	–
HEp1	6/6	7, 19, 21, 34, 42, 77	2/3	14, 14
HEp2	2/2	19, 19	1/3	14
HEp3	6/6	7, 7, 19, 42, 42, 57	1/4	14
HS1	1/1	57	–	–
J-111	3/4	6, 20, 42	–	–
КК	3/6	9, 10, 10, 18, 60	0/3	–

^а Опухоль, из которой получена линия: HeLa — рак шейки матки; HEp1 — метастаз рака шейки матки в паховом лимфатическом узле; HEp2 — первичный рак гортани; HEp3 — рецидив плоскоклеточного рака слизистой оболочки щеки спустя 6 мес после лучевого лечения; HS1 — фибросаркома; J-111 — моноцитарный лейкоз; КК — трансформированные в культуре клетки конъюнктивы.

^б Число лиц с привившейся опухолью от общего числа привитых. Некоторым больным прививали 2 опухоли и более.

^в Максимальное время обнаружения живых опухолевых клеток в биоптатах у каждого добровольца с привившейся опухолью.

из 22 привитых больных. Он продолжался у большинства до 2 нед, а у 3 больных более 6 нед. В случае регрессии опухоли воспалительная реакция была выражена слабо, хотя в ответ на другие чужеродные агенты она была нормальной. Все линии опухолевых клеток, за исключением HEp3, имели сходную динамику роста и регрессии. Последняя отличалась активным ростом, который наблюдался несмотря на воспалительную инфильтрацию. У 3 онкологических больных эта опухоль трижды рецидивировала после удаления и росла до момента смерти пациентов от основного заболевания, а у одного метастазировала в регионарные лимфатические узлы.

Существенно, что и аллотрансплантаты нормальной кожи у онкологических больных в далеко зашедшей стадии заболевания отторгались значительно позднее, чем у здоровых, или не отторгались вовсе.

Таким образом, было показано, что барьер гистосовместимости не позволяет опухолевым клеткам человека размножаться в здоровом аллогенном организме и что наличие собственной опухоли в терминальной стадии заболевания снижает этот барьер как для злокачественных, так и для нормальных трансплантатов. В то же время выявилось, что опухоли различаются по своей способности преодолевать барьер гистосовместимости. В частности, повышенной способностью обладала линия HEp3, которая была получена из рецидивировавшего после рентгенотерапии рака слизистой оболочки полости рта.

К этой же категории исследований относится и уникальный случай, когда 80-летняя мать, сохранившая по физическим и психическим показателям и знавшая об экспериментах по гетеротрансплантации опухолей, изъявила желание, чтобы ей была перевита меланома от умиравшей 55-летней дочери. Трансплантат из подкожной опухоли размером менее 0,5 см был перевит в прямую мышцу живота реципиента и удален при первых признаках роста. Несмотря на это, опухоль дала многочисленные метастазы, рост которых удавалось ингибировать химиопрепаратами в течение 1,5 года, после чего больная умерла [19]. Рассматривая причины быстрой прививки и распространения, авторы публикации (1965 г.) отмечают только, что пятью годами ранее мать была успешно оперирована по поводу рака эндометрия (пангистерэктомия) и что группа крови у нее была сходной с группой крови дочери — по американской классификации того времени соответственно A2CDE и A2cDE, в обоих случаях резус-фактор положительный.

В то же время мы нашли в литературе сообщения о перевивке опухоли человека здоровому человеку в результате несчастного случая. Достоверность этих данных подтверждена профессиональными наблюдениями, гистологическим контролем и публикацией в рецензируемых журналах. Такие случаи чрезвычайно редки и поэтому не влияют на заболеваемость хирургов злокачественными опухолями. В то же время еще М. А. Новинский в своей диссертации писал: «Ввиду возможности прививания злокачественных новообразований операторы должны быть осторожны при экстирпации злокачественных новообразований».

Случай 1. *Лаборантка 19 лет перевивала клетки культуры аденокарциномы человека мышцам. Уколола руку иглой, которой перевивала опухоль. Спустя 2 нед на месте укола возникла опухоль, которая к моменту удаления — 19-му дню достигла размеров 9 × 4 × 4 мм. Опухоль, представлявшая собой типичную аденокарциному, была удалена и в дальнейшем не рецидивировала. Иммунодефицита у лаборантки не было, тем не менее воспалительная инфильтрация опухоли отсутствовала. Клетки опухоли секретируют муцин и дали положительную реакцию на α-фетопротейн. Комплекс гистосовместимости у девушки был представлен HLA A2, A11, B44 и Bw55, а в клетках линии аденокарциномы HLA A2, B13 и Bw50 [20].*

Случай 2. *Во время срочной операции по поводу злокачественной фиброзной гистиоцитомы хирург поранил кисть левой руки. Порез был немедленно дезинфицирован. Спустя 5 мес на месте пореза появилась твердая округлая опухоль диаметром 3 см. Тщательное иммунологическое исследование показало отсутствие у хирурга признаков иммунодефицита. Опухоль была удалена без рецидива.*

Гистологически новообразование оказалось идентичным опухоли пациента — злокачественной фиброзной гистиоцитомой. На периферии опухоли, возникшей у хирурга, находился очаг воспаления, состоявший в основном из лимфоцитов и макрофагов с небольшим количеством плазматических клеток. Несмотря на это, опухоль интенсивно росла, о чем свидетельствовали множественные фигуры митозов. Клетки обеих опу-

хелей экспрессировали виментин, α -антитрипсин и α -антихимотрипсин.

Анализ полиморфизма коротких тандемных повторов показал, что клетки опухоли хирурга являются химерами. Аллель 11 (187 п. о.) микросателлита HUMCYAR04, расположенного в четвертом интроне гена ароматазы цитохрома P-450 (локус HUMCYAR04), и аллель 8 (166 п. о.) гена HUMTH01 системы обмена дофамина были обнаружены в опухоли как пациента, так и хирурга (табл. 2). Эти гены не имеют отношения к злокачественности, и в контроле, которым служила другая злокачественная гистиоцитома, их не было.

Анализ последовательностей генов главного комплекса гистосовместимости HLA-DRB1 и DQB1 показал, что клетки опухоли хирурга гетерозиготны. Они содержали два аллеля из первичной опухоли пациента и два аллеля из клеток хирурга. Гаплотипы этих генов у пациента и хирурга были абсолютно разными. Вероятно, и по гаплотипам HLA I класса пациент и хирург тоже различались, но больной умер вскоре после операции, и взять у него нормальные клетки крови не представлялось возможным [21].

Приведенными примерами, по-видимому, не исчерпываются все случаи заражения человека опухолевыми клетками. Просто эти случаи обратили на себя внимание, поскольку опухоль развилась на месте травмы и с момента травмы до возникновения опухоли прошло сравнительно мало времени. Очевидно, что, если бы попавшая в кровотоки опухолевая клетка начала размножаться в каком-либо дистальном органе, связать возникновение опухоли с укусом или порезом было бы проблематично.

Обращает на себя внимание и то, что заражение в обоих случаях произошло минимальным количеством клеток, сравнимым с тем, которым переносятся трансмиссивные клоны опухолевых клеток у собак, тасманийского дьявола или ретикулосаркома хомяков. Если встать на точку зрения авторов публикаций о том, что оба реципиента имели нормальную систему контроля гистосовместимости, остается предположить, что привившиеся опухолевые клетки имели повышенную способность к адаптации в аллогенном организме.

В последнем случае это могла быть способность к гибридизации с клеткой хозяина, позволившая преодолеть барьер гистосовместимости.

Гибридизация клеток *in vitro*, в том числе межвидовая, широко используется для картирования генов, изучения регуляторных путей, создания продуцентов и других целей. В то же время гибридизация *in vivo* изучена в гораздо меньшей степени. Работы в этом направлении в основном имеют целью изучение механизмов прогрессирования опухолей.

Агрессивный рост и метастазирование опухоли в иммунокомпетентном организме животного другого вида представляет собой редкое явление. Тем не менее известны многие случаи такого поведения опухолей человека вскоре после их инокуляции нормальным животным. При этом нередко происходит их гибридизация с клетками хозяина.

Наиболее детально изучена спонтанная гибридизация злокачественных клеток человека с клетками хомяка при перевивке опухоли в защечный мешок. В результате

Таблица 2

Анализ полиморфных коротких повторов и генов главного комплекса гистосовместимости опухоли больного и опухоли хирурга^a [22]

Лocus	Лocus (число пар оснований)			
	опухоль больного	опухоль хирурга	кровь хирурга	контрольная опухоль
HUMCYAR04	7-3 (168) ^б	7-3 (168) ^б	7-3 (168) ^б	11 (137)
	11 (187)	11 (187)		
HUMTH01	8 (166)	6 (158)	6 (158)	6 (154)
	10 (173)	10 (173)	10 (173)	10 (170)
		8 (166)		
HUMACTBP2	31 (300)	19 (272)	19 (272)	21 (258)
	31 (300)	25 (277)	25 (277)	28 (289)
		31 (300)		
HLA-DRB1	1501	1501		
	1401	1401		-
		01	01	
		07	07	
HLA-DQB1	05031	0501	0501	
	0602	02	02	-
		05031		
		0602		

^a Полу жирным шрифтом выделены показатели хирурга, светлым — контрольной гистиоцитомы.

^б Аллель 7-3 имел делецию 3 пар оснований в 5'-фланкирующей области повтора.

возникали клоны злокачественных клеток, экспрессировавшие продукты генов как человека, так и хомяка [22; 23]. В одном из таких экспериментов клон, возникший от гибридизации клетки злокачественной глиобластомы человека и клетки хомяка, не только сохранил злокачественные свойства, но и приобрел способность при перевивке метастазировать в различные органы животного. Из 7 генетиков человека, найденных в гибридной опухоли, 3 сохранили способность экспрессировать свои белки после многих лет роста в культуре или трансплантации. Ими были CD74 (ген гистосовместимости II типа), CXCR4 (ген, индуцируемый гипоксией, который участвует в ремоделировании стенки сосудов, делая ее более проница-

емой для опухолевых клеток, двигающихся в направлении повышенного градиента концентрации кислорода) и *PLAGL2* (ген, ингибирующий дифференцировку клеток глиобластом).

В другом случае опухолевые клетки из плеврально-выпота большой аденокарциномой молочной железы были инъецированы в молочные железы бестимусной мыши. Из выросшей опухоли была получена линия, клетки которой экспрессировали гладкомышечный актин А и не экспрессировали цитокератин 7, что свидетельствует об активации стромы мышинового происхождения. В митотических клетках обнаруживался в основном мышинный полиплоидный кариотип, но 30% из них содержали хромосомы как мыши, так и человека, причем в 8% наблюдались транслокации мышь/человек. В интерфазных клетках более 60% ядер были гибридными. Таким образом, опухоль представляла собой синкарион, сформировавшийся между эпителием опухоли и нормальной соединительной тканью мыши [24]. В данном случае второй партнер гибридизации — соединительнотканная клетка мыши также подверглась трансформации.

Если раньше при исследовании аденокарцином в основном изучался эпителиальный компонент, с которым связывали основные свойства опухоли, в том числе ее метастатический потенциал, то в последнее время большое внимание стали уделять соединительнотканному микроокружению, особенно на границе с нормальной тканью, и его роли в прогрессировании опухоли. Активация стромы или «десмоплазия» обнаруживается во многих опухолях человека. Это явление представляет собой реактивацию фенотипа, подобного эмбриональному, когда начинают экспрессироваться цитокины и их рецепторы, как при заживлении раны. В злокачественных новообразованиях такого рода эпителий также изменяет свою морфологию, повышается его миграционная способность, изменяются клеточный матрикс и ангиогенные свойства. Ферменты стромы и факторы роста, рэкспрессируемые в опухолях, ничем не отличаются от нормальных прототипов, что свидетельствует в пользу эпигенетической природы этих изменений. В то же время в ДНК опухолевой стромы наблюдается утрата гетерозиготности, что отражает возможность участия генетических механизмов в ремоделировании стромы. Опухоль, состоящая из гетерогенной популяции злокачественных эпителиальных клеток и малигнизированной стромы, может быть значительно более агрессивной.

Изучение условий гибридизации нормальных и опухолевых клеток имеет прямое отношение к проблеме метастазирования. В этом случае межвидовая гибридизация является удобным инструментом, поскольку позволяет идентифицировать в синкарионе генетический материал партнеров и его экспрессию. В отношении клеток одного и того же организма это значительно труднее. В одном из экспериментов после гибридизации клеток не метастазирующей меланомы мыши с макрофагами мыши или человека среди прочих были идентифицированы агрессивно растущие гибридные клоны, дававшие метастазы более чем у 80% животных. Следует отметить, что клетки этих опухолей имели выраженный хемотаксис к среде, кондиционированной нормальными фибробластами [25].

Опухолевые клетки гибридизуются со многими клетками организма: стромальными, эпителиальными и эндотелием. В последнем случае это может быть важным моментом в проникновении опухолевых клеток через стенку сосуда с последующим формированием метастазов. Нормальными партнерами опухолей собственного организма чаще всего бывают макрофаги или стволовые клетки костного мозга [26—29].

Одним из механизмов образования синкарионов между злокачественными клетками и макрофагами или другими фагоцитами, инфильтрирующими опухоль, является фагоцитоз опухолевых клеток или их обломков.

Необходимым условием образования синкарионов является тесный контакт опухолевых клеток и макрофагов. Макрофаги могут гибридизоваться с опухолевыми клетками в силу своей способности к слиянию с другими клетками. Опухолевые клетки также могут быть склонными к этому процессу в силу aberrантной экспрессии связанных с ним рецепторов и лигандов. Например, на поверхности опухолевых клеток активно экспрессируются гликопротеины CD44 и CD47, играющие важную роль в адгезии клеток, а также β -хемокин CCL2 — наиболее мощный фактор хемотаксиса моноцитов [27; 30]. Гибридизацию опухолевых клеток с нормальными могут также индуцировать вирусы, белок синцитин — гликопротеин слияния, который кодируется геном оболочки ретровируса, встроенным в геном человека, а также хроническая активация протеинкиназы АКТ2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Злокачественные клетки могут формировать стабильные клоны, заражающие животных при контактах в естественных условиях и стабильно сохраняющиеся во времени, подобно другим инфекционным агентам. Возможно, что при формировании видов такие клоны служили одним из факторов отбора по признаку дивергенции главного комплекса гистосовместимости. Гибридизация опухолевых и нормальных клеток одного и того же вида или другого с образованием гибридных злокачественных клонов является одним из механизмов преодоления барьера гистосовместимости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шабд Л. М. Новинский — родоначальник экспериментальной онкологии. — М.: Изд. АМН СССР. — 1950. — 258 с.
2. Новинский М. А. О прививании раковых новообразований. Предварительное сообщение (из зоохирургического кабинета ад.-професс. В. Е. Воронцова) // Мед. вестн. — 1876. — № 25. — С. 14—23.
3. Novinski M. Für Frage über Impfung der screeboigen Geschwulste // Centrbl. Fur die medizin. Wissenschaft. — 1876. — Bd. 14, N 45. — S. 790 — 799.
4. Dingli D., Nowak M. Cancer biology: infectious tumour cells // Nature. — 2006. — Vol. 7, N 443. — P. 35—36.
5. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer / Murgia C., Pritchard J., Kim S., Fassati A., Weiss R. // Cell. — 2006. — Vol. 11, N 126. — P. 477—487.
6. Von Holdt B., Ostrander E. The singular history of a canine transmissible tumor // Cell. — 2006. — Vol. 11, N 126. — P. 445—447.
7. Murchison E. Clonally transmissible cancers in dogs and Tasmanian Devils // Oncogene. — 2008. — Vol. 27 (suppl. 2). — P. 19—30.
8. Rebbeck C., Leroi A., Burt A. Mitochondrial capture by a transmissible cancer // Science. — 2011. — Vol. 21, N 331. — P. 303.
9. Welsh J. Contagious cancer // Oncologist. — 2011. — Vol. 16, N 1. — P. 1—4.

10. Reduced Effect of Tasmanian Devil Facial Tumor Disease at the Disease Front / Hamede R., Lachish S., Belov K., Woods G., Kreiss A., Pearce A., Lazenby B., Jones M., McCallum H. // *Conserv. Biol.* — 2011. — Vol. 6. — P. 124—134.

11. The pathology of devil facial tumor disease (DFTD) in Tasmanian Devils (*Sarcophilus harrisii*) / Loh R., Bergfeld J., Hayes D., O'Hara A., Pyecroft S., Raidal S., Sharpe R. // *Vet. Pathol.* — 2006. — Vol. 43, N 6. — P. 890—895.

12. The immunohistochemical characterization of devil facial tumor disease (DFTD) in the Tasmanian Devil (*Sarcophilus harrisii*) / Loh R., Hayes D., Mahjoor A., O'Hara A., Pyecroft S., Raidal S. // *Vet. Pathol.* — 2006. — Vol. 43, N 6. — P. 896—903.

13. The Tasmanian Devil transcriptome reveals Schwann cell origins of a clonally transmissible cancer / Murchison E., Tovar C., Hsu A., Bender H., Kheradpour P., Rebbeck C., Obendorf D., Conlan C., Bahlo M., Blizard C., Pyecroft S., Kreiss A., Kellis M., Stark A., Harkins T., Marshall Graves J., Woods G., Hannon G., Papenfuss A. // *Science.* — 2010. — Vol. 1, N 327. — P. 84—87.

14. Allorecognition in the Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*), an endangered marsupial species with limited genetic diversity / Kreiss A., Cheng Y., Kimble F., Wells B., Donovan S., Belov K., Woods G. // *PLoS One.* — 2011. — Vol. 6, N 7. — P. 1—8.

15. Natural killer cell mediated cytotoxic responses in the Tasmanian devil / Brown G., Kreiss A., Lyons A., Woods G. // *PLoS One.* — 2011. — Vol. 6, N 9. — P. 1—10.

16. Mosquito transmission of a reticulum cell sarcoma of hamsters / Banfield W., Woke P., Mackay C., Cooper H. // *Science.* — 1965. — Vol. 28, N 148. — P. 1239—1240.

17. Moore A., Rhoads C., Southam C. Homotransplantation of human cell lines // *Science.* — 1957. — Vol. 1, N 25. — P. 158—160.

18. Southam C. M. Homotransplantation of human cell lines // *Bull. N. Y. Acad. Med.* — 1958. — Vol. 34, N 6. — P. 416—423.

19. Fatal Homotransplanted Melanoma: a case report / Scanlon E., Hawkins R., Fox W., Smith W., Gugel E., Sanders M. // *Cancer.* — 1965. — Vol. 18. — P. 782—789.

20. Gugel E., Sanders M. Needle-stick transmission of human colonic adenocarcinoma // *N. Engl. J. Med.* — 1986. — Vol. 4, N 315. — P. 1487.

21. Genetic analysis of a sarcoma accidentally transplanted from a patient to a surgeon / Gärtner H., Seidl C., Luckenbach C., Schumm G.,

Seifried E., Ritter H., Bültmann B. // *N. Engl. J. Med.* — 1996. — Vol. 335, N 20. — P. 1494—1496.

22. Gorenberg D., Pavia R., Tsao M. In vivo hybridisation of human tumour and normal hamster cells // *Nature.* — 1974. — Vol. 250. — P. 649—651.

23. Horizontal transmission and retention of malignancy, as well as functional human genes, after spontaneous fusion of human glioblastoma and hamster host cells in vivo / Goldenberg D., Zagzag D., Heselmeyer-Haddad K., Berroa Garcia L., Ried T., Loo M., Chang C., Gold D. // *Int. J. Cancer.* — 2012. — Vol. 131, N 1. — P. 49—58 [Epub 30.08.2011].

24. Spontaneous Fusion with, and Transformation of Mouse Stroma by, Malignant Human Breast Cancer Epithelium / Jacobsen B., Harrell J., Jedlicka P., Borges V., Varella-Garcia M., Horwitz K. // *Cancer Res.* — 2006. — Vol. 66, N 16. — P. 8274—8279.

25. Melanoma × macrophage hybrids with enhanced metastatic potential / Rachkovsky M., Sodi S., Chakraborty A., Avissar Y., Bologna J., McNiff J., Platt J., Bermudes D., Pawelek J. // *Clin. Exp. Metastasis.* — 1998. — Vol. 16, N 4. — P. 299—312.

26. Spontaneous fusion between cancer cells and endothelial cells / Mortensen K., Lichtenberg J., Thomsen P., Larsson L. // *Cell. Mol. Life. Sci.* — 2004. — Vol. 61, N 16. — P. 2125—2131.

27. Pawelek J., Chakraborty A. Fusion of tumour cells with bone marrow-derived cells: a unifying explanation for metastasis // *Nat. Rev. Cancer.* — 2008. — Vol. 8, N 5. — P. 377—386.

28. Cytogenetic abnormalities of tumor-associated endothelial cells in human malignant tumors / Akino T., Hida K., Hida Y., Tsuchiya K., Freedman D., Muraki C., Ohga N., Matsuda K., Akiyama K., Harabayashi T., Shinohara N., Nonomura K., Klagsbrun M., Shindoh M. // *Am. J. Pathol.* — 2009. — Vol. 175, N 6. — P. 2657—2667.

29. Pawelek J. Viewing malignant melanoma cells as macrophage-tumor hybrids // *Cell. Adh. Migr.* — 2007. — Vol. 1, N 1. — P. 2—6.

30. Bone marrow-derived cells fuse with normal and transformed intestinal stem cells / Rizvi A., Swain J., Davies P., Bailey A., Decker A., Wilenbring H., Grompe M., Fleming W., Wong M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2006. — Vol. 103, N 16. — P. 6321—6325.

Поступила 09.02.2012

Gennady Alterovich Belitsky¹, Marianna Gennadievna Yakubovskaya²

INFECTIOUS TUMOR CELL CLONES (TO THE 135th ANNIVERSARY OF THE FIRST TUMOR TRANSPLANTATION BY M. A. NOVINSKY AND 110th BIRTHDAY OF L. M. SHABAD)

¹ MD, PhD, DSc, Professor, Leading Researcher, Chemical Carcinogenesis Department, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Centre, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

² MD, PhD, DSc, Head, Chemical Carcinogenesis Department, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Centre, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

Address for correspondence: Belitsky Gennady Alterovitch, Chemical Carcinogenesis Department, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Centre, RAMS, 24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478; e-mail: belitsga@gmail.com

This is an overview of contemporary data concerning contamination of animals and humans by cancer cells. The paper describes results of study of canine transmissible venereal tumor and epizooty of facial tumor disease in the Tasmanian devil — the largest extant marsupial carnivore endemic in Tasmania, as well as reticulum cell sarcoma of hamsters. It also presents results of transplantation of cancer cell lines to volunteers and cases of accidental tumor transplantation from a patient to the surgeon or by needle stick from malignant cell culture to the laboratory assistant. Mechanisms of cancer cell transmission in animals and humans are discussed.

Key words: M. A. Novinsky, L. M. Shabad, tumor transmission, canine venereal tumor, Tasmanian devil facial tumor, reticulum cell sarcoma.

Мария Борисовна Дюкалова¹

РАЗРАБОТКА ПЕПТИДНЫХ ВАКЦИН ДЛЯ АКТИВНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, АССОЦИИРОВАННОГО С ГИПЕРПРОДУКЦИЕЙ ОНКОБЕЛКА HER-2

¹ Аспирантка, отдел химии и биологии, Научно-исследовательская часть Новосибирского государственного университета (630090, РФ, г. Новосибирск, ул. Пирогова, г. 2)

Адрес для переписки: 630090, РФ, г. Новосибирск, ул. Жемчужная, д. 32, кв. 10, Дюкалова Мария Борисовна; e-mail: dukerman@mail.ru

Доказанная роль белка HER-2 в онкогенезе рака молочной железы, а также его гиперпродукция только в малигнизированных тканях делают его подходящей мишенью для направленной терапии. Современные методы противоопухолевой иммунотерапии можно разделить на две большие группы: активная иммунотерапия (индуцирует иммунный ответ) и пассивная (осуществляется за счет введения в организм иммунологически активных субстанций: антитела, лимфоциты, макрофаги). Данный обзор посвящен пептидным вакцинам как элементам активной иммунотерапии, позволяющим вызвать эффективный эндогенный опухолеспецифический клеточный и гуморальный ответ.

Ключевые слова: активная иммунотерапия, пептидные вакцины, противоопухолевый иммунитет.

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РЕЦЕПТОРА HER-2

HER-2 (ErbB-2, neu, p185) — член семейства тирозинкиназных рецепторов эпидермального фактора роста, которое включает еще три рецептора: EGFR (HER-1), HER-3 и HER-4 [1]. Они обладают сходной структурой и общими лигандами, к которым имеют различное сродство, и играют главную роль в процессах развития и дифференцировки тканей эпителиального, мезенхимального и нейронального происхождения [2; 3]. Рецепторы ErbB состоят из внеклеточного домена длиной 630 аминокислотных остатков, имеющего сайты гликозилирования, трансмембранного домена и внутриклеточного тирозинкиназного домена [4]. Связывание лиганда с внеклеточным доменом индуцирует димеризацию рецептора и активацию тирозинкиназы, после аутофосфорилирования, которой запускается каскад реакций передачи митогенного сигнала [5]. Результат этого каскада зависит от лиганда [6], силы его связывания с рецептором (влияет на мощность и продолжительность сигнала) [7], от устойчивости комплекса лиганд—рецептор при различных рН [8]. Предпочтительным партнером для гетеродимеризации является HER-2, поскольку, не имея собственного лиганда, он обладает «открытой» формой, которую остальные члены семейства приобретают только после взаимодействия с лигандом [9]. Таким образом, HER-2 в любой момент способен к димеризации с остальными рецепторами эпителиального фактора роста (ЭФР) и подобных ЭФР пептидов.

Продукция каждого белка семейства ErbB зависит от типа клеток и стадии развития [10; 11]. Молочная железа является органом, экстенсивно развивающимся в постнатальном периоде [12], и HER-2, по-видимому, играет ключевую роль в дифференцировке клеток альвеол молочной железы, которые ответственны за синтез молочного белка [13]. Гиперпродукция белка HER-2 обусловлена увеличением дозы гена в 2—20 раз за счет его амплификации [14] или за счет спонтанной полисомии 17-й хромосомы, в которой локализован данный ген [15]. Повышение представленности уникального рецептора семейства ErbB приводит к его активации без необходимой в нормальных случаях димеризации в результате связывания лиганда. Запускаемый каскад реакций приводит к гиперплазии и малигнизации ткани [16].

Гиперэкспрессия HER-2 обнаруживается в 20—30% случаев рака молочной железы (РМЖ) у человека [17] и оказывается ассоциированной с ухудшением общей и безрецидивной выживаемости пациенток [18], а также резистентностью опухоли к химио- и лучевой терапии [19].

ВАКЦИНЫ, ИНИЦИИРУЮЩИЕ ИНДУКЦИЮ Т-КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА

Развитие рака, продуцирующего большое количество HER-2, и его негативный статус обусловлены отсутствием иммунного ответа вследствие толерантности иммунной системы к собственным белкам. Исследование иммунного статуса пациенток с распространенным HER-2-положительным РМЖ показало, что у некоторых из них в организме имеются специфические к данному

антигену антитела (АТ) и цитотоксические лимфоциты (ЦТЛ) [20]. Однако уровень собственного иммунного ответа оказался слишком низким, чтобы быть эффективным. V. Goodell и соавт. выявили прямую зависимость величины такого ответа от уровня гиперпродукции HER-2 на опухолевых клетках [21]. Важной причиной, по которой иммунный статус больных со злокачественными новообразованиями может быть нарушен, является иммуносупрессия Т-лимфоцитов, обусловленная спровоцированным опухолью нарушением баланса синтеза ряда цитокинов интерлейкина (ИЛ) 2, ИЛ-6, кислотолабильной фракции интерферона (ИНФ) α/β , ИНФ- γ , фактора некроза опухоли α [22], а также утраты опухолевыми клетками молекул главного комплекса гистосовместимости (HLA) обоих классов.

Цитотоксические Т-лимфоциты CD8+ считаются главными эффекторными клетками противоопухолевого иммунитета. Усиление Т-клеточного ответа, повышение его специфичности представляется важной задачей, решение которой, вероятно, приведет к созданию эффективного иммунотерапевтического средства. Преобладавшие ранее экспериментальные методы стимулирования цитотоксического иммунного ответа *in vivo* — вакцинация пациентов целыми опухолевыми клетками, их лизатами [23; 24] — являются дорогостоящими, производство этих агентов трудно стандартизуется. В настоящее время большое внимание уделяют вакцинам на основе рекомбинантных вирусов [25; 26], ДНК-вакцинам [27], вакцинам на основе дендритных клеток (ДК) [28; 29], пептидов, способных процессироваться и презентироваться так же, как и нативные антигены [30; 31].

В составе многих опухолевых антигенов, в том числе ErbB-2, с помощью компьютерного анализа [32] прогнозируются эпитопы для HLA I [33]. В ранних клинических экспериментах иммунизацию пациенток пептидными вакцинами проводили с дополнительным введением ИНФ- γ или адьюванта Фрейнда [34]. Результаты показали, что этого недостаточно для выработки сильного и длительного иммунного ответа. Иммуносупрессия, развивающаяся у пациенток с распространенными злокачественными опухолями, становится причиной низкой эффективности вакцины, включающей эпитопы для HLA I и простые адьюванты.

Для вакцинации пептидами, рестрицированными по HLA I, требуется дополнительная антигенспецифичная или неспецифичная Т-хелперная активность для увеличения силы и продолжительности иммунного ответа [30]. Это может быть достигнуто с помощью нагруженных пептидами ДК [35], добавления чужеродных хелперных эпитопов, например эпитопов вируса гриппа [36] или кори, Т-хелперных эпитопов целевого антигена [37–39], агонистов Toll-подобных рецепторов [40], а также включением в вакцину CpG-мотивов [41; 42], иммуномодуляторов (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, ИЛ-2, ИЛ-15) [38; 43]. В настоящее время активно исследуются вакцины, основанные на смеси эпитопов HLA разных классов, а также ведутся поиски Т-хелперных эпитопов, взаимодействующих с высокой степенью родства с различными гаплотипами HLA II [30; 37; 39; 42; 44]. В результате этих исследова-

ний стало ясно, что можно подобрать эпитопы, которые эффективно будут презентироваться (сходным с нативным белком образом) HLA того или другого класса у большинства пациентов и окажутся перспективными для создания противораковых вакцин. Очевидной также стала необходимость использования адьювантов различного рода для увеличения силы и продолжительности Т-клеточного ответа.

Недостатком активной иммунотерапии антигенными пептидами является то, что сила Т-клеточного противоопухолевого иммунитета оказывается недостаточной при больших опухолях, поэтому она рекомендована для пациенток с опухолями ранних стадий после хирургического и/или лучевого лечения после устранения основной массы опухоли. Значительно более сильный противоопухолевый Т-клеточный иммунитет может быть достигнут с использованием адаптивной иммунотерапии, которая подразумевает забор у пациента анергичных Т-клеток, активацию их *ex vivo*, наработку большого количества этих клеток и обратное введение их в организм человека. Этот подход позволяет повысить количество опухолеспецифичных Т-лимфоцитов в организме пациента в 25 раз, таким образом значительно усиливая противоопухолевый иммунитет [45].

Исследование механизмов противоопухолевого клеточного иммунитета позволило констатировать, что специфичная реакция на собственные антигены, возникающая после иммунизации пептидными вакцинами, имитирует патогенетические пути аутоиммунных заболеваний [46].

ПАССИВНАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРАСТУЗУМАБА

Важная роль HER-2 в развитии агрессивного РМЖ, удобство использования рецептора в качестве мишени для иммунотерапии дали толчок развитию пассивной иммунотерапии моноклональными антителами (МКАТ), результатом которого стали широко используемые в настоящее время на практике препараты на основе МКАТ.

Разными исследовательскими группами наработано множество мышинных моноклональных АТ против внеклеточного домена HER-2 путем иммунизации мышей клетками человека, усиленно продуцирующими этот рецептор. В зависимости от эпитопа внеклеточного домена, с которым связывались анти-HER-2 АТ, наблюдались ингибирование или стимуляция опухолевого роста либо эффект взаимодействия отсутствовал [47].

Терапевтическое МКАТ трастузумаб создано путем гуманизации мышинового МКАТ, отобранного по показателю сильного антипролиферативного эффекта [48]. Механизм действия трастузумаба окончательно не определен, но предполагается, что он складывается из нескольких процессов: связывание МКАТ с рецептором стимулирует его эндоцитоз и удаление с поверхности мембраны (с помощью этого процесса в норме контролируется продолжительность сигнала от активированного рецептора) [3], опосредует антигенозависимую клеточную цитотоксическую реакцию (АЗКЦТ), а также блокирует димеризацию рецепторов [49; 50]. Показано также, что трастузумаб активирует рестрикцию внеклеточного домена HER-2 от трансмембранного региона [51].

Трастузумаб связывается с С-концевым участком IV субдомена внеклеточного домена HER-2, который в рецепторах HER-1 и HER-3 координируется со II субдоменом во время активации при связывании лиганда [52]. Район протяженностью 579—625 аминокислотных остатков (а. о.), связывающий Fab-фрагмент трастузумаба, формирует 3 петли за счет дисульфидных мостиков. Первая петля — 579—583 а. о. — образована двумя дисульфидными мостиками между цистеинами в позициях 563 и 576, 567 и 584. Связывание этой петли с трастузумабом обусловлено электростатическими взаимодействиями.

Вторая петля — 592—595 а. о. — сформирована за счет пары C587—C596; связывание с АТ происходит за счет гидрофобных взаимодействий.

Третья петля — 615—625 а. о. — образована мостиком между C600—C626; связывание обусловлено, так же как и у первой петли, электростатическими взаимодействиями [9; 53].

Несмотря на доказанную клиническую эффективность трастузумаба в монорежиме [54], в рамках терапии первой линии [55], а также в сочетании с широким спектром цитотоксических средств [56; 57], его применение имеет ограничения. Во-первых, это побочный эффект в виде сердечной недостаточности [58], что исключает данную терапию у пациенток с нарушением функции сердца, пожилых пациенток, а также в сочетании с антрациклинами [59]. Во-вторых, трастузумаб обладает коротким временем действия, что приводит к необходимости многократного введения препарата и, соответственно, увеличению стоимости лечения [60]. Кроме того, есть возможность наработки антиидиотипических АТ против мышинового Fab-фрагмента трастузумаба.

Однако противоопухолевая эффективность МКАТ позволяет сделать вывод о том, что гуморальный компонент иммунного ответа также в значительной степени способен ингибировать опухолевый рост и вакцины, направленные на индукцию опухолеспецифичного В-клеточного иммунитета, должны иметь успех [61].

ПОДХОДЫ В ПОИСКЕ ПЕПТИДОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВАКЦИН, ИНИЦИИРУЮЩИХ ГУМОРАЛЬНЫЙ ОТВЕТ

Знания о структуре HER-2, о последовательностях, обуславливающих связывание МКАТ с рецептором, ложатся в основу создания новых терапевтических средств, направленных против клеток, усиленно продуцирующих данный антиген. Данные терапевтические средства позволят обойти ограничения, возникающие при применении пассивной иммунотерапии. Это может произойти с помощью индукции наработки эндогенных поликлональных антител, которые способны долго циркулировать в организме и благодаря которым существует возможность преодолеть толерантность иммунной системы к собственным антигенам, которым является и HER-2. Вакцины на основе пептидов, полученных из HER-2, высокоиммуногенны и безвредны с точки зрения возможности развития аутоиммунной патологии [62].

Поиск таких пептидов, инициирующих наработку противоопухолевых АТ и стимулирующих дифференцировку В-лимфоцитов в клетки памяти, может вестись в двух направлениях. Если известна кристаллическая структура антигена, то с помощью компьютерного ана-

лиза можно построить трехмерную модель и определить эпитопы для конкретного АТ, структура которого также определена. Можно выявить предположительные В-клеточные эпитопы, проанализировав третичную структуру на наличие регионов, удобных для связывания АТ. Технология фазового дисплея позволяет без знания первичной структуры антигена отобрать мимотопы, которые будут имитировать пространственную структуру его эпитопов для конкретных МКАТ.

ПЕПТИДЫ-ДЕРИВАТЫ ИЗ ОБЛАСТИ СВЯЗЫВАНИЯ HER-2 И ТРАСТУЗУМАБА

Группа ученых из университета Огайо с помощью компьютерного анализа выбрала 4 последовательности, перекрывающие область внеклеточного домена HER-2 с 563 по 626 а. о. и содержащие каждая хотя бы по одному региону, участвующему в связывании трастузумаба [53]. Исследователи синтезировали эти конструкции, обратив внимание на важность дисульфидных связей для создания более стабильных трехмерных структур, близких к нативным [63]. Такие конформационные пептиды индуцировали наработку АТ, обладающих наиболее высоким сродством и опосредующих более сильные АЗКЦТ и редукцию опухоли у трансгенных мышей [53].

Авторы данной работы сходным образом создали и исследовали эпитопы еще одного противоопухолевого МКАТ, используемого в клинике для лечения опухолей, усиленно продуцирующих HER-2, — пертузумаба, который связывает участок района, ответственного за димеризацию рецепторов (II субдомен внеклеточного домена) [64].

Использование комбинированных вакцин, содержащих несколько пептидов, повторяющих эпитопы для ингибирующих МКАТ, позволяет преодолеть толерантность иммунной системы к собственному белку, чего нельзя достигнуть при иммунизации нативным белком HER-2 [60]. Для того чтобы усилить гуморальный ответ и преодолеть ограничения, связанные с большим полиморфизмом HLA и, соответственно, низким Т-хелперным ответом, синтезированные пептиды конъюгировали с Т-клеточным эпитопом белка вируса кори [65]. При иммунизации смесью пептидов авторы наблюдали наработку эндогенных АТ, обладающих свойствами, сходными с таковыми трастузумаба и пертузумаба. Их повышенный титр показан в клинических исследованиях I фазы наряду с безопасностью вакцины и отсутствием побочных эффектов в виде аутоиммунных заболеваний и кардиотоксичности [66].

ПЕПТИДЫ — ПРЕДПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ В-КЛЕТОЧНЫЕ ЭПИТОПЫ

Группа австрийских исследователей с помощью компьютерного анализа подобрала 7 предположительных В-клеточных эпитопов, которые в дальнейшем были синтезированы, конъюгированы со столбнячным токсином как иммуногенным носителем, который часто используется для создания моно- и поливалентных вакцин для человека [67]. Среди этих пептидов оказались высокоиммуногенные конструкции, способные индуцировать наработку высокого титра АТ, специфичных к опухолевым клеткам, которые усиленно продуцируют HER-2, и опос-

редующих такие ненаправленные механизмы воздействия на опухоль, как АЗКЦТ и комплементзависимая клеточная цитотоксичность (КЗКЦТ) [68]. По данным К. Kim и соавт., противоопухолевый эффект оказывают АТ, принадлежащие к изотипам IgG2a и IgG2b [69]. В связи с этим австрийские исследователи обратили внимание на возможность повышения эффективности антипептидных АТ путем дополнительного введения Т-хелперных цитокинов (ИЛ-15 и ИЛ-18, ИНФ- γ) и адьювантов (СrG-олигонуклеотиды и бактериальные компоненты) [70].

По данным клинических исследований I фазы, мультипептидная вакцина, основанная на В-клеточных эпитопах, безопасна, хорошо переносится и способна преодолевать иммунологическую толерантность. Кроме того, клинический эффект эндогенных анти-HER-2-АТ сопоставим в эффектом МАТ, используемых в пассивной иммунотерапии [71].

ПЕПТИДЫ, ИМИТИРУЮЩИЕ ЭПИТОПЫ ИНГИБИРУЮЩИХ МКАТ

Поскольку биологический эффект МКАТ, связывающихся с HER-2, зависит от эпитопа [47], были разработаны две стратегии, действие которых было основано на эпитопспецифичности и конформационной мимикрии.

Первая стратегия — наработка антиидиотипических АТ [72] — заключается в наработке АТ на опухолевый антиген, дальнейшей наработке антиидиотипических АТ и во введении их в организм в целях индукции эндогенных анти-антиидиотипических АТ, которые должны узнавать опухолевый антиген в организме. Данный подход был успешно реализован для разработки терапии против В-клеточных лимфом [73] и различных других онкологических заболеваний, хотя методика работы с антиидиотипическими АТ сложна, требует много времени и больших материальных затрат и имеет ограничения, среди которых большой размер молекул АТ, содержание в них чужеродного материала [72].

Принципиально отличным методом является фаговый дисплей. Фаговые пептидные библиотеки состоят из частиц нитчатого фага, в оболочечные белки которого встроены случайные пептидные последовательности (чаще всего в белки рIII и рVIII) длиной от 6 до 38 а. о. Подобные библиотеки обладают репертуаром более 10⁹ пептидов [74], среди которых с применением процедуры биопеннинга с нужным АТ можно отобрать пептиды, которые будут имитировать эпитоп, специфичный для данного АТ. Особенно привлекательным этот метод представляется из-за того, что с помощью него отбираются пептиды, имитирующие конформационную структуру эпитопов, в том числе небелковой природы, т. е. углеводов и липидов [75; 76]. Для формирования более жесткой структуры, подходящей для взаимодействия с целевым АТ, были созданы фаговые пептидные библиотеки, в которых чужеродная встройка фланкирована цистеинами [77]. Пептиды, имитирующие эпитопы антигенов, называются мимотопами [78].

Группа А. Rieme и соавт. в качестве целевого АТ использовала трастузумаб, противоопухолевые свойства которого подробно изучены. В результате биопеннинга 10-мерной циклической фаговой пептидной библиотеки были отобраны 5 мимотопов [79]. Многочисленные тесты

на мимикрию подтвердили, что данные пептиды эффективно имитируют природный эпитоп, находящийся на HER-2 и связывающий трастузумаб. Поликлональные АТ, нарабатанные в результате иммунизации пептидами, опосредовали АЗКЦТ и КЗКЦТ, ускоряли интернализацию рецепторов с клеточной поверхности, дозозависимо и высокоспецифично ингибировали пролиферацию опухолевых клеток. Одним из преимуществ применения фагового дисплея для поиска мимотопов является исключение возможности отбора пептидов, имитирующих эпитопы, связывание с которыми на нативном HER-2 усиливает опухолевый рост [79].

Обратив внимание на то, что при повышенном титре IgE, который обнаруживается при паразитарных инфекциях и аллергических заболеваниях, наблюдается устойчивость к образованию опухолей [80], А. Rieme и соавт. сформировали мимотопную вакцину в форме перорального средства. При этом способе введения были достигнуты результаты по наработке эндогенных анти-HER-2 IgE, которые реализовывали гуморальный иммунный ответ, вызывая также клеточный ответ в виде АЗКЦТ [81].

Группа исследователей из Китая провела скрининг 12-мерной фаговой пептидной библиотеки, также используя трастузумаб в качестве целевого АТ. Из 26 отобранных ими клонов 25 содержали одну и ту же аминокислотную последовательность, не гомологичную HER-2. В составе полученного пептида оказались аминокислотные остатки, сходные с теми, которые формируют эпитоп в нативном антигене: глутаминовая кислота, тирозин и пролин (в HER-2 им соответствуют аспарагиновая кислота, фенилаланин и пролин) [9; 82]. Таким образом был отобран еще один мимотоп, который взаимодействует с высоким сродством с паратопом трастузумаба и является перспективным для создания пептидной вакцины [82].

Поскольку собственно фаговые частицы отобранных клонов не могут использоваться для иммунизации как носители из-за больших размеров и содержания чужеродной ДНК, несущей гены устойчивости к антибиотикам, а также белков, способных при повторном введении фагов привести к анафилактическому шоку, необходимо подобрать к синтезированному мимотопу подходящий носитель. Им могут оказаться упомянутые столбнячный токсин, белок вируса кори, а также гемоцианин, глутатион-S-трансфераза [78].

Технология фагового дисплея представляет собой простой и надежный инструмент поиска пептидов, с высокой точностью имитирующих эпитоп HER-2, узнаваемый трастузумабом, и индуцирующих наработку эндогенных АТ, которые ингибируют рост опухолевых клеток. Использование данной методики исключает возможность возникновения эпитопспецифичной биологической индукции опухолевого роста, а в зависимости от типа введения мимотопной вакцины и применения дополнительных иммуномодуляторов можно индуцировать наработку иммуноглобулинов желаемых классов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В 70-е годы XX века исследование МКАТ открыло новую эру в противоопухолевой иммунотерапии, хотя скоро стало очевидным, что их использование имеет серьезные ограничения.

В 80-е годы после выяснения эффекторной роли ЦТЛ в разрушении опухолевых клеток внимание исследователей сфокусировалось на разработке подходов для индукции антигенспецифичных Т-клеток. В данном направлении исследователи столкнулись с проблемой наличия у солидных опухолей механизмов избегания Т-клеточного распознавания, а также с ограничениями, связанными с разнообразием гаплотипов HLA. Исследование пептидных вакцин, представляющих смеси дериватов опухолевого антигена, показало их способность индуцировать специфичный ответ ЦТЛ, преодолевая иммунологическую толерантность. Включение в эту смесь пептидов, связывающихся с различными гаплотипами HLA (дериватов этого же антигена или известных чужеродных эпитопов), позволяет повысить возможность применения вакцины у большего числа пациентов и усилить цитотоксический клеточный ответ активацией Т-хелперов, чего можно достичь также путем дополнительного использования нагруженных антигенами дендритных клеток, агонистов Toll-подобных рецепторов, CpG-олигонуклеотидов, иммуномодуляторов.

С развитием технологии гуманизации АТ и созданием МКАТ, обладающих выраженными противоопухолевыми свойствами, стало ясно, что гуморальный иммунный ответ также играет большую роль в супрессии опухолевого роста. Дороговизна использования МКАТ в терапии, а также ограничения, связанные с побочными эффектами и коротким периодом действия, побуждают исследователей разрабатывать подходы, позволяющие индуцировать специфичный В-клеточный ответ. С использованием компьютерного анализа кристаллических структур терапевтического АТ и антигена можно выяснить последовательности, отвечающие за их связывание; анализ структуры антигена позволяет предположить участки связывания АТ. При анализе опухолевых антигенов, являющихся рецепторами факторов роста, необходимо учитывать явление эпитопспецифичного биологического действия АТ, т. е. отобрать именно те пептиды, которые индуцируют наработку АТ, подавляющих опухолевый рост. Данная проблема ликвидируется при использовании технологии фагового дисплея, позволяющей отобрать пептиды, имитирующие терапевтически важные эпитопы для МАТ, используемых в клинике.

Ясно, что пептидная вакцина окажется максимально эффективной, если будет способна, избегая иммунотолерантности, индуцировать Т-клеточный (ЦТЛ, Т-хелперы) и В-клеточный ответы одновременно. В настоящее время в большинстве случаев иммунотерапия может использоваться лишь как компонент комбинированной терапии опухолевых заболеваний, позволяющий избавиться от метастазов, остатков опухоли после операции и предотвратить рецидив болезни за счет дифференцировки В-клеток в плазмциты во время вакцинации. Однако перспективность развития описанных вакцин кажется очевидной.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yarden Y., Sliwkowski M. X. Untangling the ErbB signaling network // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* — 2001. — Vol. 2, N 2. — P. 127—137.
2. Press M. F., Cordon-Cardo C., Slamon D. J. Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues // *Oncogene.* — 1990. — Vol. 5, N 7. — P. 953—962.

3. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer / Olayioye M. A., Neve R. M., Lane H. A., Hynes N. E. // *EMBO J.* — 2000. — Vol. 19, N 13. — P. 3159—3167.
4. Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens // *Ann. Rev. Biochem.* — 1987. — Vol. 56. — P. 881—914.
5. Hubbard S. R., Miller W. T. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling // *Curr. Opin. Cell. Biol.* — 2007. — Vol. 19, N 2. — P. 117—123.
6. Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development / Luetke N. C., Qiu T. H., Fenton S. E., Troyer K. L., Riedel R. F., Chang A., Lee D. C. // *Development.* — 1999. — Vol. 126, N 12. — P. 2739—2750.
7. Tzahar E., Yarden Y. The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1998. — Vol. 1377, N 1. — P. 25—37.
8. Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by the pH sensitivity of the receptor/ligand interaction / French A. R., Tadaki D. K., Niyogi S. K., Lauffenburger D. A. // *J. Biol. Chem.* — 1995. — Vol. 270, N 9. — P. 4334—4340.
9. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab / Cho H. S., Mason K., Ramyar K. X., Stanley A. M., Gabelli S. B., Denney D. W. Jr., Leahy D. J. // *Nature.* — 2003. — Vol. 421, N 6924. — P. 756—760.
10. Schroeder J. A., Lee D. C. Dynamic expression and activation of ERBB receptors in the developing mouse mammary gland // *Cell. Growth Differ.* — 1998. — Vol. 9, N 6. — P. 451—464.
11. Changes in ErbB2 (her-2/neu), ErbB3, and ErbB4 during growth, differentiation, and apoptosis of normal rat mammary epithelial cells / Darcy K. M., Zangani D., Wohlhueter A. L., Huang R. Y., Vaughan M. M., Russell J. A., Ip M. M. // *J. Histochem. Cytochem.* — 2000. — Vol. 48, N 1. — P. 63—80.
12. Hennighausen L., Robinson G. W. Think globally, act locally: the making of a mouse mammary gland // *Genes Dev.* — 1998. — Vol. 12, N 4. — P. 449—455.
13. Jones F. E., Stern D. F. Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation // *Oncogene.* — 1999. — Vol. 18, N 23. — P. 3481—3490.
14. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene / Slamon D. J., Clark G. M., Wong S. G., Levin W. J., Ullrich A., McGuire W. L. // *Science.* — 1987. — Vol. 235, N 4785. — P. 177—182.
15. Aneusomy 17 in breast cancer: its role in HER-2/neu protein expression and implication for clinical assessment of HER-2/neu status / Wang S., Hossein Saboorian M., Frenkel E. P., Haley B. B., Siddiqui M. T., Gokaslan S., Hynan L., Ashfaq R. // *Mod Pathol.* — 2002. — Vol. 15, N 2. — P. 137—145.
16. Alroy I., Yarden Y. Biochemistry of HER2 oncogenesis in breast cancer // *Breast Dis.* — 2000. — Vol. 11. — P. 31—48.
17. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer / Slamon D. J., Godolphin W., Jones L. A., Holt J. A., Wong S. G., Keith D. E., Levin W. J., Stuart S. G., Udove J., Ullrich A. et al. // *Science.* — 1989. — Vol. 244, N 4905. — P. 707—712.
18. Slamon D. J. Proto-oncogenes and human cancers // *N. Engl. J. Med.* — 1987. — Vol. 317, N 15. — P. 955—957.
19. Choudhury A., Kiessling R. Her-2/neu as a paradigm of a tumor-specific target for therapy // *Breast Dis.* — 2004. — Vol. 20. — P. 25—31.
20. Pre-existent immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with HER-2/neu overexpressing breast and ovarian cancer / Disis M. L., Knutson K. L., Schiffman K., Rinn K., McNeel D. G. // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2000. — Vol. 62, N 2. — P. 245—252.
21. Level of HER-2/neu protein expression in breast cancer may affect the development of endogenous HER-2/neu-specific immunity / Goodell V., Waisman J., Salazar L. G., de la Rosa C., Link J., Coveler A. L., Childs J. S., Fintak P. A., Higgins D. M., Disis M. L. // *Mol. Cancer Ther.* — 2008. — Vol. 7, N 3. — P. 449—454.
22. Козлов В. К., Молчанов О. Е., Жаринин Г. М. Иммуноterapia рекомбинантными цитокинами в лечении онкологических больных / *Успехи клинической иммунологии и аллергологии.* — М.: Изд-во регионального отделения РАЕН, 2002. — С. 263—279.
23. Allogeneic breast cancer cell vaccines / Dols A., Meijer S. L.,

Smith J. W. 2nd, Fox B. A., Urba W. J. // *Clin. Breast Cancer*. — 2003. — Vol. 3, Suppl. 4. — P. 173—180.

24. Goodell V., Disis M. L. Human tumor cell lysates as a protein source for the detection of cancer antigen-specific humoral immunity // *J. Immunol. Methods*. — 2005. — Vol. 299, N 1—2. — P. 129—138.

25. Activation of tumor antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) by human dendritic cells infected with an attenuated influenza A virus expressing a CTL epitope derived from the HER-2/neu proto-oncogene / Efferson C. L., Schickli J., Ko B. K., Kawano K., Mouzi S., Palese P., García-Sastre A., Ioannides C. G. // *J. Virol*. — 2003. — Vol. 77, N 13. — P. 7411—7424.

26. Antibody-dependent natural killer cell-mediated cytotoxicity engendered by a kinase-inactive human HER2 adenovirus-based vaccination mediates resistance to breast tumors / Triulzi C., Vertuani S., Curcio C., Antognoli A., Seibt J., Akusjärvi G., Wei W. Z., Cavallo F., Kiessling R. // *Cancer Res*. — 2010. — Vol. 70, N 19. — P. 7431—7441.

27. The «A, B and C» of Her-2 DNA vaccine development / Wei W. Z., Jacob J., Radkevich-Brown O., Whittington P., Kong Y. C. // *Cancer Immunol. Immunother.* — 2008. — Vol. 57, N 11. — P. 1711—1717.

28. Brossart P. Dendritic cells in vaccination therapies of malignant diseases // *Transfus. Apher. Sci.* — 2002. — Vol. 27, N 2. — P. 183—186.

29. Differential immune responses mediated by adenovirus- and lentivirus-transduced DCs in a HER-2/neu overexpressing tumor model / Felizardo T. C., Wang J. C., McGray R. A., Eveleigh C., Spaner D. E., Fowler D. H., Bramson J. L., Medin J. A. // *Gene Ther.* — 2011. — Vol. 18, N 10. — P. 986—995.

30. Immunization of cancer patients with a HER-2/neu, HLA-A2 peptide, p369—377, results in short-lived peptide-specific immunity / Knutson K. L., Schiffman K., Cheever M. A., Disis M. L. // *Clin. Cancer Res*. — 2002. — Vol. 8, N 5. — P. 1014—1018.

31. Linear and branched glyco-lipopeptide vaccines follow distinct cross-presentation pathways and generate different magnitudes of antitumor immunity / Renaudet O., Dasgupta G., Bettahi I., Shi A., Nesburn A. B., Dumy P., BenMohamed L. // *PLoS One*. — 2010. — Vol. 5, N 6. — e11216.

32. Sung M. H., Simon R. Candidate epitope identification using peptide property models: application to cancer immunotherapy // *Methods*. — 2004. — Vol. 34, N 4. — P. 460—467.

33. Generation of immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with breast and ovarian cancer using a peptide-based vaccine / Disis M. L., Grabstein K. H., Sleath P. R., Cheever M. A. // *Clin. Cancer Res*. — 1999. — Vol. 5, N 6. — P. 1289—1297.

34. Zaks T. Z., Rosenberg S. A. Immunization with a peptide epitope (p369—377) from HER-2/neu leads to peptide-specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER-2/neu+ tumors // *Cancer Res*. — 1998. — Vol. 58, N 21. — P. 4902—4908.

35. Enhanced maturation and functional capacity of dendritic cells induced by mannosylated L2 domain of ErbB2 receptor / Zhong G., Wang J., Xu M., Xie Z., Yu M., Wang J., Zhou T., Gong W., Sun Y., Hu M., Zhang X., Shen B., Guo N. // *Scand. J. Immunol.* — 2005. — Vol. 62, N 2. — P. 108—116.

36. Activation of tumor antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) by human dendritic cells infected with an attenuated influenza A virus expressing a CTL epitope derived from the HER-2/neu proto-oncogene / Efferson C. L., Schickli J., Ko B. K., Kawano K., Mouzi S., Palese P., García-Sastre A., Ioannides C. G. // *J. Virol*. — 2003. — Vol. 77, N 13. — P. 7411—7424.

37. Knutson K. L., Schiffman K., Disis M. L. Immunization with a HER-2/neu helper peptide vaccine generates HER-2/neu CD8 T-cell immunity in cancer patients // *J. Clin. Invest.* — 2001. — Vol. 107, N 4. — P. 477—484.

38. Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines / Disis M. L., Gooley T. A., Rinn K., Davis D., Piepkorn M., Cheever M. A., Knutson K. L., Schiffman K. // *J. Clin. Oncol.* — 2002. — Vol. 20, N 11. — P. 2624—2632.

39. Immunization of cancer patients with HER-2/neu-derived peptides demonstrating high-affinity binding to multiple class II alleles / Salazar L. G., Fikes J., Southwood S., Ishioka G., Knutson K. L., Gooley T. A., Schiffman K., Disis M. L. // *Clin. Cancer Res*. — 2003. — Vol. 9, N 15. — P. 5559—5565.

40. Peptide vaccine given with a Toll-like receptor agonist is effective for the treatment and prevention of spontaneous breast tumors / Nava-

Parada P., Forni G., Knutson K. L., Pease L. R., Celis E. // *Cancer Res*. — 2007. — Vol. 67, N 3. — P. 1326—1334.

41. Davila E., Celis E. Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine-containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity // *J. Immunol.* — 2000. — Vol. 165, N 1. — P. 539—547.

42. HER-2/neu (657—665) represents an immunogenic epitope of HER-2/neu oncoprotein with potent antitumor properties / Gritzapis A. D., Fridman A., Perez S. A., La Monica N., Papamichail M., Aurisicchio L., Baxevanis C. N. // *Vaccine*. — 2009. — Vol. 28, N 1. — P. 162—170.

43. Stimulation of human T cells by an influenza A vector expressing a CTL epitope from the HER-2/neu protooncogene results in higher numbers of antigen-specific TCRhi cells than stimulation with peptide. Divergent roles of IL-2 and IL-15 / Efferson C. L., Kawano K., Tsuda N., Palese P., García-Sastre A., Ioannides C. G. // *Anticancer Res*. — 2005. — Vol. 25, N 2A. — P. 715—724.

44. A degenerate HLA-DR epitope pool of HER-2/neu reveals a novel in vivo immunodominant epitope, HER-2/neu88-102 / Karyampudi L., Formicola C., Erskine C. L., Maurer M. J., Ingle J. N., Krco C. J., Wettstein P. J., Kalli K. R., Fikes J. D., Beebe M., Hartmann L. C., Disis M. L., Ferrone S., Ishioka G., Knutson K. L. // *Clin. Cancer Res*. — 2010. — Vol. 16, N 3. — P. 825—834.

45. Generation of tumor-reactive CTL against the tumor-associated antigen HER2 using retrovirally transduced dendritic cells derived from CD34+ hemopoietic progenitor cells / Meyer zum Büschenfelde C., Nicklisch N., Rose-John S., Peschel C., Bernhard H. // *J. Immunol.* — 2000. — Vol. 165, N 7. — P. 4133—4140.

46. Vaccination against the HER-2/neu oncogenic protein / Bernhard H., Salazar L., Schiffman K., Smorlesi A., Schmidt B., Knutson K. L., Disis M. L. // *Endocr. Relat. Cancer*. — 2002. — Vol. 9, N 1. — P. 33—44.

47. Identification of epitope regions recognized by tumor inhibitory and stimulatory anti-ErbB-2 monoclonal antibodies: implications for vaccine design / Yip Y. L., Smith G., Koch J., Dübel S., Ward R. L. // *J. Immunol.* — 2001. — Vol. 166, N 8. — P. 5271—5278.

48. Nahta R., Hortobagyi G. N., Esteva F. J. Novel pharmacological approaches in the treatment of breast cancer // *Expert. Opin. Investig. Drugs*. — 2003. — Vol. 12, N 6. — P. 909—921.

49. Harari D., Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer / *Oncogene*. — 2000. — Vol. 19, N 53. — P. 6102—6114.

50. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin) / Sliwkowski M. X., Lofgren J. A., Lewis G. D., Hotaling T. E., Fendly B. M., Fox J. A. // *Semin. Oncol.* — 1999. — Vol. 26, N 4, Suppl. 12. — P. 60—70.

51. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells / Molina M. A., Codony-Servat J., Albanell J., Rojo F., Arribas J., Baselga J. // *Cancer Res*. — 2001. — Vol. 61, N 12. — P. 4744—4749.

52. Dimerization of the p185neu transmembrane domain is necessary but not sufficient for transformation / Burke C. L., Lemmon M. A., Corren B. A., Engelman D. M., Stern D. F. // *Oncogene*. — 1997. — Vol. 14, N 6. — P. 687—696.

53. Novel engineered trastuzumab conformational epitopes demonstrate in vitro and in vivo antitumor properties against HER-2/neu / Garrett J. T., Rawale S., Allen S. D., Phillips G., Forni G., Morris J. C., Kaurmaya P. T. // *J. Immunol.* — 2007. — Vol. 178, N 11. — P. 7120—7131.

54. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease / Cobleigh M. A., Vogel C. L., Tripathy D., Robert N. J., Scholl S., Fehrenbacher L., Wolter J. M., Paton V., Shak S., Lieberman G., Slamon D. J. // *J. Clin. Oncol.* — 1999. — Vol. 19, N 9. — P. 2639—2648.

55. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer / Vogel C. L., Cobleigh M. A., Tripathy D., Gutheil J. C., Harris L. N., Fehrenbacher L., Slamon D. J., Murphy M., Novotny W. F., Burchmore M., Shak S., Stewart S. J., Press M. // *J. Clin. Oncol.* — 2002. — Vol. 20, N 3. — P. 719—726.

56. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2 / Slamon D. J., Leyland-Jones B., Shak S., Fuchs H., Paton V., Bajamonde A., Fleming T.,

Eiermann W., Wolter J., Pegram M., Baselga J., Norton L. // *N. Engl. J. Med.* — 2001. — Vol. 344, N 11. — P. 783—792.

57. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer / Romond E. H., Perez E. A., Bryant J., Suman V. J., Geyer C. E. Jr., Davidson N. E., Tan-Chiu E., Martino S., Paik S., Kaufman P. A., Swain S. M., Pisansky T. M., Fehrenbacher L., Kutteh L. A., Vogel V. G., Visscher D. W., Yothers G., Jenkins R. B., Brown A. M., Dakhil S. R., Mamounas E. P., Lingle W. L., Klein P. M., Ingle J. N., Wolmark N. // *N. Engl. J. Med.* — 2005. — Vol. 353, N 16. — P. 1673—1684.

58. Keefe D. L. Trastuzumab-associated cardiotoxicity // *Cancer.* — 2002. — Vol. 95, N 7. — P. 1592—1600.

59. McKeage K., Perry C. M. Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2 // *Drugs.* — 2002. — Vol. 62, N 1. — P. 209—243.

60. A chimeric multi-human epidermal growth factor receptor-2 B cell epitope peptide vaccine mediates superior antitumor responses / Dakappagari N. K., Pyles J., Parihar R., Carson W. E., Young D. C., Kaumaya P. T. // *J. Immunol.* — 2003. — Vol. 170, N 8. — P. 4242—4253.

61. Endogenous anti-HER2 antibodies block HER2 phosphorylation and signaling through extracellular signal-regulated kinase / Montgomery R. B., Makary E., Schiffman K., Goodell V., Disis M. L. // *Cancer Res.* — 2005. — Vol. 65, N 2. — P. 650—656.

62. Гриневич Ю. А., Храновская Н. Н. Современные концепции иммуноterapiи в онкологии (обзор литературы и собственных исследований) // *Журн. АМН України.* — 2007. — Т. 13, № 4. — С. 645—655.

63. Conformational HER-2/neu B-cell epitope peptide vaccine designed to incorporate two native disulfide bonds enhances tumor cell binding and antitumor activities / Dakappagari N. K., Lute K. D., Rawale S. V., Steele J. T., Allen S. D., Phillips G., Reilly R. T., Kaumaya P. T. // *J. Biol. Chem.* — 2005. — Vol. 280, N 1. — P. 54—63.

64. Peptide vaccines of the HER-2/neu dimerization loop are effective in inhibiting mammary tumor growth in vivo / Allen S. D., Garrett J. T., Rawale S. V., Jones A. L., Phillips G., Forni G., Morris J. C., Oshima R. G., Kaumaya P. T. // *J. Immunol.* — 2007. — Vol. 179, N 1. — P. 472—482.

65. Partidos C. D., Steward M. W. Prediction and identification of a T cell epitope in the fusion protein of measles virus immunodominant in mice and humans // *J. Gen. Virol.* — 1990. — Vol. 71, N 9. — P. 2099—2105.

66. Phase I active immunotherapy with combination of two chimeric, human epidermal growth factor receptor 2, B-cell epitopes fused to a promiscuous T-cell epitope in patients with metastatic and/or recurrent solid tumors / Kaumaya P. T., Foy K. C., Garrett J., Rawale S. V., Vicari D., Thurmond J. M., Lamb T., Mani A., Kane Y., Balint C. R., Chalupa D., Otterson G. A., Shapiro C. L., Fowler J. M., Grever M. R., Bekaii-Saab T. S., Carson W. E. 3rd. // *J. Clin. Oncol.* — 2009. — Vol. 27, N 31. — P. 5270—5277.

67. André F. E. Development and clinical application of new polyvalent combined paediatric vaccines // *Vaccine.* — 1999. — Vol. 17, N 13—14. — P. 1620—1627.

68. Inhibition of tumor cell growth by antibodies induced after vaccination with peptides derived from the extracellular domain of Her-2/neu / Jasinska J., Wagner S., Radauer C., Sedivy R., Brodowicz T., Wiltshcke C., Breiteneder H., Pehamberger H., Scheiner O., Wiedermann U., Zielinski C. C. // *Int. J. Cancer.* — 2003. — Vol. 107, N 6. — P. 976—983.

69. Both the epitope specificity and isotype are important in the antitumor effect of monoclonal antibodies against Her-2/neu antigen /

Kim K. M., Shin E. Y., Moon J. H., Heo T. H., Lee J. Y., Chung Y., Lee Y. J., Cho H. M., Shin S. U., Kang C. Y. // *Int. J. Cancer.* — 2002. — Vol. 102, N 4. — P. 428—434.

70. Delayed tumor onset and reduced tumor growth progression after immunization with a Her-2/neu multi-peptide vaccine and IL-12 in c-neu transgenic mice / Wagner S., Jasinska J., Breiteneder H., Kundi M., Pehamberger H., Scheiner O., Zielinski C. C., Wiedermann U. // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2007. — Vol. 106, N 1. — P. 29—38.

71. A virosomal formulated Her-2/neu multi-peptide vaccine induces Her-2/neu-specific immune responses in patients with metastatic breast cancer: a phase I study / Wiedermann U., Wiltshcke C., Jasinska J., Kundi M., Zurbriggen R., Garner-Spitzer E., Bartsch R., Steger G., Pehamberger H., Scheiner O., Zielinski C. C. // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2010. — Vol. 119, N 3. — P. 673—683.

72. Anti-idiotypic antibodies in cancer treatment / de Cerio A. L., Zabalegui N., Rodriguez-Calvillo M., Inogés S., Bendandi M. // *Oncogene.* — 2007. — Vol. 26, N 25. — P. 3594—3602.

73. Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors / Kwak L. W., Campbell M. J., Czerwinski D. K., Hart S., Miller R. A., Levy R. // *N. Engl. J. Med.* — 1992. — Vol. 327, N 17. — P. 1209—1215.

74. Smith G. P. Surface presentation of protein epitopes using bacteriophage expression systems // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 1991. — Vol. 2, N 5. — P. 668—673.

75. Systematic amino acid substitutions improved efficiency of GD2-peptide mimotope vaccination against neuroblastoma / Bleeke M., Fest S., Huebener N., Landgraf C., Schraven B., Gaedicke G., Volkmer R., Lode H. N. // *Eur. J. Cancer.* — 2009. — Vol. 45, N 16. — P. 2915—2921.

76. Kozbor D. Cancer vaccine with mimotopes of tumor-associated carbohydrate antigens // *Immunol. Res.* — 2010. — Vol. 46, N 1—3. — P. 23—31.

77. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides. I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides / Luzzago A., Felici F., Tramontano A., Pessi A., Cortese R. // *Gene.* — 1993. — Vol. 128, N 1. — P. 51—57.

78. Knittelfelder R., Riemer A. B., Jensen-Jarolim E. Mimotope vaccination—from allergy to cancer // *Expert. Opin. Biol. Ther.* — 2009. — Vol. 9, N 4. — P. 493—506.

79. Generation of Peptide mimics of the epitope recognized by trastuzumab on the oncogenic protein Her-2/neu / Riemer A. B., Klingner M., Wagner S., Bernhaus A., Mazzucchelli L., Pehamberger H., Scheiner O., Zielinski C. C., Jensen-Jarolim E. // *J. Immunol.* — 2004. — Vol. 173, N 1. — P. 394—401.

80. Immunogenicity of filamentous phage displaying peptide mimotopes after oral administration / Delmastro P., Meola A., Monaci P., Cortese R., Galfrè G. // *Vaccine.* — 1997. — Vol. 15, N 11. — P. 1276—1285.

81. Active induction of tumor-specific IgE antibodies by oral mimotope vaccination / Riemer A. B., Untermayr E., Knittelfelder R., Duschl A., Pehamberger H., Zielinski C. C., Scheiner O., Jensen-Jarolim E. // *Cancer Res.* — 2007. — Vol. 67, N 7. — P. 3406—3411.

82. A novel peptide isolated from a phage display peptide library with trastuzumab can mimic antigen epitope of HER-2 / Jiang B., Liu W., Qu H., Meng L., Song S., Ouyang T., Shou C. // *J. Biol. Chem.* — 2005. — Vol. 280, N 6. — P. 4656—4662.

Поступила 01.12.2011

Maria Borisovna Dyukalova¹

**DEVELOPMENT OF PEPTIDE VACCINES FOR ACTIVE IMMUNOTHERAPY
OF HER-2 OVERPRODUCTION-ASSOCIATED BREAST CANCER**

*¹ MD, Postgraduate Student, Chemistry and Biology Department, Novosibirsk State University
(2, Pirogova ul., Novosibirsk, RF, 630090)*

Address for correspondence: Dyukalova Maria Borisovna, kv. 10, d. 32, Zhemchuzhnaya ul.,
Novosibirsk, RF, 630090; e-mail: dukerman@mail.ru

The HER-2 proven involvement in breast cancer oncogenesis and overproduction only in malignant tissue make this protein a good therapy target. Contemporary approaches to anticancer immunotherapy may be divided into two large groups, i. e. active (inducing immune response) and passive (administration of immunologically active substances, such as antibody, lymphocytes, macrophages) immunotherapies. This overview discusses peptide vaccines as active immunotherapy agents inducing effective endogeneous tumor-specific cell-mediated and humoral immune response.

Key words: active immunotherapy, peptide vaccines, antitumor immunity.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Людмила Викторовна Спирина¹, Ирина Викторовна Кондакова²,
Евгений Анатольевич Усынин³, Захар Александрович Юрмазов⁴

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ И ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ ПРОТЕОСОМНОЙ СИСТЕМОЙ ПРИ МЕТАСТАЗИРОВАНИИ РАКА ПОЧКИ

¹ К. м. н., старший научный сотрудник, лаборатория биохимии опухолей
ФГБУ НИИ онкологии СО РАМН (634050, РФ, г. Томск, пер. Кооперативный, г. 5)

² Д. м. н., профессор, заведующий, лаборатория биохимии опухолей
ФГБУ НИИ онкологии СО РАМН (634050, РФ, г. Томск, пер. Кооперативный, г. 5)

³ К. м. н., старший научный сотрудник, отделение общей онкологии
ФГБУ НИИ онкологии СО РАМН (634050, РФ, г. Томск, пер. Кооперативный, г. 5)

⁴ Врач, отделение общей онкологии ФГБУ НИИ онкологии СО РАМН
(634050, РФ, г. Томск, пер. Кооперативный, г. 5)

Адрес для переписки: 634050, РФ, г. Томск, пер. Кооперативный, д. 5,
ФГБУ НИИ онкологии СО РАМН, отделение общей онкологии, Спирина Людмила Викторовна;
e-mail: SpirinaLV@oncology.tomsk.ru

В патогенезе рака почки важную роль играет активация неопластического фактора роста эндотелия (VEGF) в результате действия транскрипционного фактора, индуцированного гипоксией (HIF-1 α). Изучена регуляция экспрессии транскрипционных факторов: транскрипционного фактора, индуцированного гипоксией, ядерного транскрипционного фактора карра-В (субъединицы p65 и p50) и фактора роста эндотелия протеосомы в ткани светлоклеточного почечно-клеточного рака при его метастазировании. Получены данные, свидетельствующие о том, что для рака почки характерно повышение активности не только HIF-1-зависимого сигнального пути, результатом которого является усиление экспрессии фактора роста эндотелия, но и путей, зависимых от ядерного транскрипционного фактора карра-В, что, вероятно, связано с протеосомной системой. В опухолях, характеризующихся появлением отдаленных метастазов, наблюдалось выраженное снижение тотальной активности протеосом по сравнению с опухолями без метастазов. Выявлены корреляции между уровнем фактора роста эндотелия, транскрипционных факторов и активностью протеосом в ткани светлоклеточного рака почки. Полученные результаты позволяют рассматривать протеосомы в качестве потенциального механизма регуляции неопластического фактора роста эндотелия и метастазирования в тканях рака почки.

Ключевые слова: рак почки, метастазирование, ядерный транскрипционный фактор карра-В, NF- κ B, транскрипционный фактор, индуцированный гипоксией, HIF-1 α , фактор роста эндотелия, VEGF, протеосома.

Заболеваемость раком почки (РП) в настоящее время неуклонно растет, что обусловлено как улучшением диагностики новообразований данного органа, так и ростом истинной заболеваемости [1]. Ежегодно в мире регистрируется около 230 тыс. новых случаев РП и более 100 тыс. смертей от этого заболевания. В России заболеваемость

данном видом опухоли возросла с 1998 по 2008 г. с 9,0 до 12,2 на 100 тыс. населения. Заболевание характеризуется отсутствием ранних симптомов, поздней клинической манифестацией и резистентностью к химио- и лучевой терапии [2]. Основной причиной летальности при РП служат отдаленные метастазы, механизм развития которых исследован недостаточно.

В основе неопластической трансформации при РП лежат стабильные генетические повреждения, связанные с мутацией гена *VHL* (von Hippel—Lindau), которая приво-

дит к повышенной экспрессии внутриклеточного транскрипционного фактора, индуцированного гипоксией (hypoxia inducible factor, HIF). Фактор транскрипции HIF активируется в условиях гипоксии, связан с ангиогенезом и приводит к усилению основного обмена, энергетического обмена и увеличению экспрессии фактора роста эндотелия (vascular endothelial growth factor, VEGF) [3].

В большинстве случаев гипоксический фактор транскрипции представлен HIF-1, который представляет собой гетеродимер, состоящий из субъединиц α и β ; β -субъединицы являются конститутивными. Активность фактора в условиях гипоксии зависит, главным образом, от экспрессии и посттрансляционной модификации α -субъединиц [4].

Семейство факторов роста эндотелия представлено пятью членами: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и плацентарным фактором роста. Процесс неангиогенеза обеспечивается фактором VEGF-A, который называют VEGF [5]. Прогрессирование светлоклеточного РП тесно связано с активацией процессов неангиогенеза, что вызывает развитие гематогенных метастазов [5; 6].

Ключевым фактором транскрипции, связанным с процессами апоптоза и контролем пролиферации клеток, является ядерный транскрипционный фактор карра-В (nuclear factor карра-В, NF- κ B). Он проявляет активность только в димерной форме, причем его наиболее распространенными формами являются димеры субъединиц p50 или p52 с субъединицей p65, которые проявляют транскрипционную активность, в то время как гомодимер p50/50 снижает активацию специфических участков ДНК и считается неактивным комплексом [7]. В настоящее время выявлено влияние NF- κ B на экспрессию транскрипционного фактора HIF-1 α и его активацию в условиях нормоксии [8].

Один из механизмов регуляции содержания транскрипционных факторов NF- κ B и HIF-1 α — осуществляемый протеосомами внутриклеточный специфический протеолиз. Протеосомы представляют собой мультиферментные каталитические комплексы, в которых происходит деградация до 80% собственных белков клетки. Протеосомы представлены двумя пулами: 26S и 20S [9; 10]. Прикрепление цепочки убиквитина к белку и его последующая деградация в протеосоме наблюдаются при гидроксировании остатков пролина и аспарагина. Для разрушения фактора HIF-1 важно связывание его с белком VHL. Известно, что снижение деградации HIF-1 α при использовании ингибиторов протеосом или гипоксии приводит к значительному повышению экспрессии VEGF в опухолевых клетках [11]. При светлоклеточном почечноклеточном раке накопление фактора HIF-1 α и рост экспрессии VEGF связаны с мутационными изменениями белка VHL [12]. Вероятно, следствием данных изменений является неспособность транскрипционного фактора HIF-1 α утилизироваться в протеосомном комплексе.

Активация транскрипционного фактора NF- κ B также осуществляется протеосомами. В отсутствие стимулирующих сигналов NF- κ B находится в цитоплазме в ассоциации с ингибитором (I- κ B). Ключевым этапом активации NF- κ B является освобождение его из комплекса с I- κ B и протеосомная деградация последнего [13].

Посттрансляционная модификация p105 — предшественника NF- κ B p50 также осуществляется с помощью протеосом [14].

Однако в настоящее время протеолитическая регуляция экспрессии транскрипционных и ростовых факторов, их взаимное влияние в злокачественных опухолях почки изучены недостаточно. Проведение подобных исследований в ткани светлоклеточного РП наиболее актуально ввиду роли данных факторов в прогрессировании заболевания.

Целью проведенного исследования служило изучение регуляции экспрессии транскрипционных факторов NF- κ B, HIF-1 α и содержания VEGF протеосомами в ткани светлоклеточного РП при его метастазировании.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование вошли 54 больных с верифицированным светлоклеточным РП (средний возраст $57,6 \pm 2,2$ года). Группу без метастазов (N0M0) составили 38 больных (средний возраст $58,5 \pm 1,8$ года), N1M1 стадия заболевания имела у 16 больных ($57,2 \pm 3,1$ года). Диагностику заболевания и лечение больных РП осуществляли в соответствии с рекомендуемыми алгоритмами диагностики и лечения злокачественных новообразований, утвержденными Минздравсоцразвития России. Проведение данной работы одобрено этическим комитетом ФГБУ НИИ онкологии СО РАМН.

Материалом для исследования протеосом служили образцы опухолевой и гистологически неизменной ткани, находящиеся на расстоянии не менее 2 см от границы опухолей и полученные при выполнении радикального хирургического вмешательства. После забора эти образцы замораживали и хранили при температуре -80°C .

Получение осветленных гомогенатов

Замороженную ткань (100 мг) гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 мМ трис-HCl буфера (pH 7,5), содержащего 2 мМ АТФ, 5 мМ хлорид магния, 1 мМ дитиотреитол, 1 мМ ЭДТА и 100 мМ хлорид натрия. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 10 000 г и температуре 4°C .

Фракционирование протеосом

Все процедуры проводили при температуре 4°C . Белки осветленных гомогенатов фракционировали с помощью сульфата аммония в два этапа. Фракцию, обогащенную 26S-протеосомами, получали добавлением сульфата аммония до 40% насыщения, фракцию 20S-протеосом — добавлением сульфата аммония до 70% насыщения [15]. В полученных фракциях определяли активность протеосом.

Определение активности протеосом

Химотрипсинподобную активность тотального пула протеосом, пулов протеосом 26S и 20S определяли в осветленных гомогенатах опухолевых и неизмененных тканей, а также во фракциях протеосом, по гидролизу флуорогенного олигопептида N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin, утилизирующегося химотрипсинподобными центрами протеосом [16], на

флуориметре «Hitachi-850» (Япония) при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. Реакционная смесь для определения активности 20S протеосом содержала 20 мМ трис-НСl (рН 7,5), 1 мМ дитиотреитол, 30 мкМ N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin. Для определения активности 26S протеосом в реакционную смесь дополнительно вводили 5 мМ хлорида магния и 1 мМ АТФ. Реакцию проводили при температуре 37 °С в течение 20 мин и останавливали при добавлении 1% додецил сульфата натрия. Для оценки активности примесных протеаз в образцах применяли специфический ингибитор протеосом MG132. Удельную активность протеосом выражали в единицах активности на 1 мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури.

Определение содержания VEGF, HIF-1 α , NF- κ B p50 и NF- κ B p65

Образцы осветленных гомогенатов опухолей использовали для определения содержания VEGF (R&D Systems, DSL, США), HIF-1 α , субъединиц NF- κ B p50 и NF- κ B p65 (Caymanchem, США) методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) на ИФА-анализаторе «Anthos 2020». Приготовление и очистку ядерных экстрактов тканевого гомогената проводили в соответствии с рекомендациями фирмы — производителя наборов. Уровень белка в гомогенатах и ядерных экстрактах определяли по методу Лоури. Результаты определения содержания VEGF выражали в пикограммах на 1 мг белка, а HIF-1 α , NF κ B p50 и NF κ B p65 — в условных единицах на 1 мг белка в лунке.

Статистическая обработка

Для статистической обработки данных применяли пакет статистических программ Statistica 6.0. В зависимости от вида распределения результаты представлены как $m \pm M$ (где m — среднее выборочное, M — ошибка среднего) или в виде медианы с интерквартильным размахом (25-й и 75-й процентиля). Значимость различий исследовали с помощью t-критерия Стьюдента или критерия Манна—Уитни. Корреляционный анализ был проведен с использованием непараметрического критерия Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявленные изменения в экспрессии транскрипционных факторов и VEGF в ткани рака почки в зависимости от наличия гематогенных метастазов представлены в таблице. Экспрессия HIF-1 α и NF- κ B p65 повышалась в группе N1M1 в 1,5 и 4,6 раза соответственно, что сопровождалось ростом содержания VEGF в 2,2 раза по сравнению с группой пациентов со стадией N0M0. Коэффициент NF- κ B p65/NF- κ B p50, указывающий на количество активных гетеродимеров, увеличился у больных с распространенным заболеванием в 5 раз по сравнению с таковым у больных с локализованным РП.

Исследование активности протеосом в ткани светлоклеточного РП позволило выявить, что totalная активность и активность пулов 26S протеосом и 20S протеосом в ткани опухоли были ниже, чем в соответствующей нормальной ткани, в 3,5, 2,4 и 2,5 раза соответственно

Таблица

Активность протеосом, содержание транскрипционных факторов и VEGF при РП и отдаленном метастазировании

Показатель	Группа больных со стадией N0M0 (n = 38)	Группа больных со стадией N1M1 (n = 16)
Содержание HIF-1 α , усл. ед./мг белка в лунке	5,6 \pm 1,0	8,6 \pm 1,9*
Содержание NF- κ B p50, усл. ед./мг белка в лунке	8,1 \pm 1,0	10,3 \pm 4,8
Содержание NF- κ B p65, усл. ед./мг белка в лунке	6,9 \pm 1,3	31,8 \pm 19,8*
NF- κ B p65/NF- κ B p50	1,3 \pm 0,2	6,6 \pm 2,6*
Содержание VEGF, пг/мг белка	102,8 \pm 15,25	232,8 \pm 42,6*
Totalная активность протеосом, $\times 10^3$ усл. ед./мг белка	57,0 \pm 7,4	31,2 \pm 5,7*
Активность 26S, $\times 10^3$ усл. ед./мг белка	16,7 \pm 2,3	12,9 \pm 3,5
Активность 20S, $\times 10^3$ усл. ед./мг белка	43,3 \pm 6,9	29,9 \pm 7,9

* $p < 0,05$ для различий по сравнению с группой больных N0M0.

(рис. 1). Известно, что интенсивный протеолиз в ткани почки существует в физиологических условиях и связан

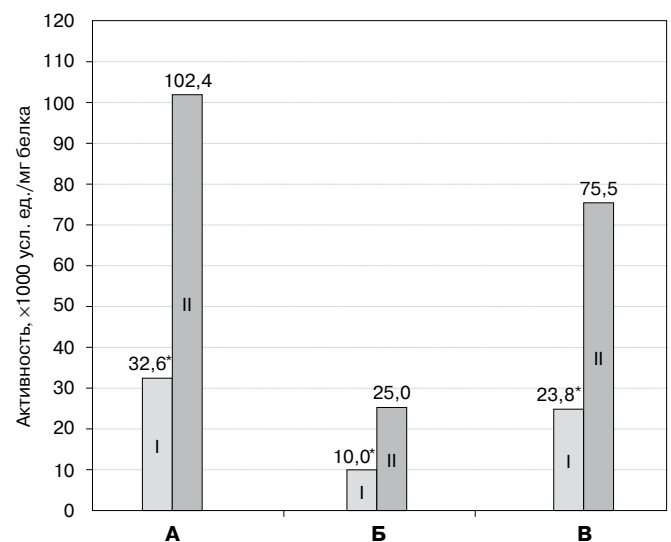


Рисунок 1. Totalная активность протеосом и активность их пулов в ткани РП. I — опухолевая ткань; II — неизмененная ткань. * $p < 0,05$ по сравнению с неизмененной тканью.

А. Totalная активность протеосом. **Б.** Активность пула 26S. **В.** Активность пула 20S.

с процессами деградации альбумина в проксимальных канальцах почки [17]. Следовательно, снижение активности протеолиза при злокачественной трансформации тканей почки, возможно, обусловлено нарушением функции почечного эпителия.

Активность протеосом и их пулов у больных локализованным РП и при его метастазировании представлена в таблице. Наблюдалось снижение как тотальной активности протеосом, так и активности пулов 26S и 20S протеосом в образцах опухолей с метастазами по сравнению с таковыми у пациентов со стадией N0M0. При этом достоверно значимые различия выявлены только для тотальной активности протеосом. Снижение активности протеосом на фоне увеличения уровня транскрипционных факторов HIF-1 α и NF- κ B p65 дает основание предположить существование связи между внутриклеточным протеолизом и экспрессией транскрипционных факторов при метастазировании РП.

Для подтверждения этого предположения был проведен корреляционный анализ, который позволил выявить слабые, статистически значимые связи между активностью 26S протеосом, экспрессией NF- κ B p65 ($r = -0,32$; $p < 0,05$) и содержанием HIF-1 α ($r = -0,36$; $p < 0,05$) (рис. 2, А, Б). Отрицательная корреляция между активностью 26S протеосом и экспрессией NF- κ B p65 свидетельствует о существовании возможных, независимых от протеосом механизмов активации транскрипционного фактора NF- κ B p65. Известно, что активация NF- κ B

происходит при фосфорилировании ДНК-связывающих субъединиц фактора [18] или за счет других протеолитических ферментов [19]. Снижение активности протеосом 26S, осуществляющего деградацию транскрипционного фактора HIF-1 α [5], приводит к повышению содержания фактора в опухоли и, как следствие, к активации неоангиогенеза. Содержание HIF-1 α также ассоциировалось с уровнем VEGF ($r = 0,81$; $p < 0,05$) и NF- κ B p65 ($r = 0,93$; $p < 0,05$) (рис. 2, В, Г). Полученные данные подтверждают влияние транскрипционного фактора NF- κ B на уровень экспрессии HIF-1 α в ткани РП, что согласуется с данными А. L. Goldberg (2007) [20]. Результаты корреляционного анализа также подтвердили связь экспрессии VEGF с уровнем HIF-1 α . Вероятно, накопление транскрипционного фактора HIF-1 α при РП, ассоциированное с высоким содержанием VEGF, происходит не только при снижении деградации его протеосомами, но и за счет усиленной экспрессии NF- κ B.

На рис. 3 представлена гипотетическая схема взаимосвязей между экспрессией факторов HIF-1 α , NF- κ B и VEGF с активностью протеосом в ткани светлоклеточного РП. Содержание транскрипционных факторов NF- κ B, HIF-1 α связано с активностью протеосом 26S. Повышение содержания транскрипционного фактора NF- κ B и его активных форм при прогрессировании РП сопровождается ростом уровня HIF-1 α на фоне снижения активности протеосом. При этом накопление транскрипционного фактора HIF-1 α при РП, вероятно,

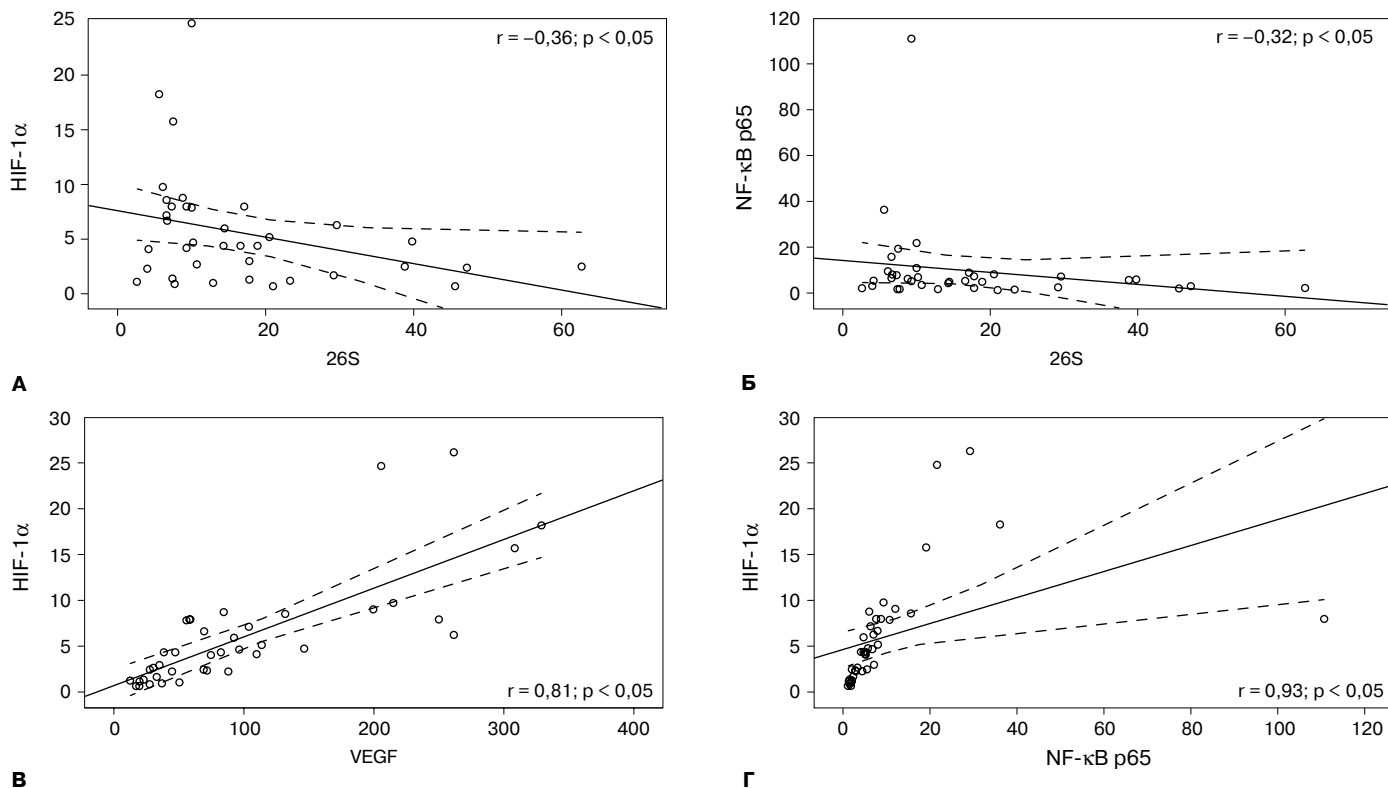


Рисунок 2. Графики рассеяния корреляций. Пунктирными линиями обозначен 95% доверительный интервал.
А. Между активностью пула 26S протеосом и содержанием HIF-1 α . **Б.** Между активностью пула 26S протеосом и содержанием NF- κ B p65. **В.** Между экспрессией HIF-1 α и содержанием VEGF. **Г.** Между экспрессией HIF-1 α и содержанием NF- κ B p65.

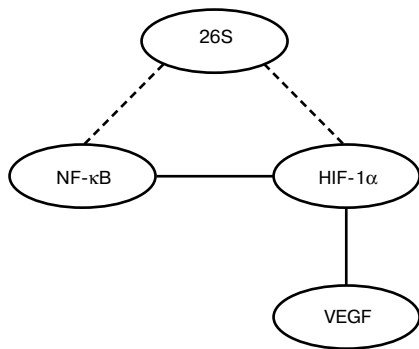


Рисунок 3. Схема возможной взаимосвязи активности пула 26S протеосом с экспрессией NF-κB, HIF-1α и VEGF при РП. Сплошная линия — положительная связь; пунктирная линия — отрицательная связь.

является результатом сниженной деградации фактора протеосомами и, возможно, усиленной экспрессии NF-κB. Высокая экспрессия VEGF характерна для процессов метастазирования при светлоклеточном РП. Повышение содержания этого фактора роста сочеталось с увеличением уровня транскрипционного фактора HIF-1α.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие метастазов при светлоклеточном РП, вероятно, регулируется протеосомной системой и сопровождается не только высокой экспрессией транскрипционного HIF-1α и ростового фактора VEGF, но и увеличением содержания фактора NF-κB. Одним из механизмов, связанных с активацией неоангиогенеза и регуляцией метастазирования при светлоклеточном РП, является снижение активности протеосом, которое происходит на фоне активации NF-κB-зависимого пути. При этом отмечена связь активности протеосом с экспрессией транскрипционного фактора HIF-1α и ростового фактора VEGF. В свою очередь высокое содержание HIF-1α, возможно, обусловлено ростом экспрессии NF-κB. В целом, полученные данные указывают, что в механизм метастазирования вовлечены протеосомы и их дальнейшее изучение может стать основой для разработки новых дополнительных критериев прогноза течения РП и поиска эффективных противоопухолевых средств при молекулярно-направленной терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы (ФЦП) «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (Гос. контракт № П-320).

ЛИТЕРАТУРА

- Jonasch E. Presurgical therapy in metastatic renal cell carcinoma // *Expert. Rev. Anticancer Ther.* — 2007. — Vol. 7, N 1. — P. 73—78.
- Михайленко Д. С., Любченко Л. Н., Залетаев Д. В. ДНК-диагностика наследственного рака почки // *Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН.* — 2010. — № 2. — С. 10—18.

3. mAKAP compartmentalizes oxygen-dependent control of HIF-1α / Wong W., Goehring A. S., Kapiloff M. S., Langeberg L. K., Scott J. D. // *Sci Signal.* — 2008. — Vol. 1, N 51. — P. 1—18.

4. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in clear cell renal cell carcinoma / Klatte T., Seligson D. B., Riggs S. B., Leppert J. T., Berkman M. K. // *Clin. Cancer Res.* — 2007. — Vol. 13. — P. 7388—7393.

5. Фактор роста эндотелия сосудов и его рецептор 2-го типа в опухолях и сыворотке крови больных раком почки / Кушлинский Н. Е., Трапезникова М. Ф., Герштейн Е. С., Глыбин П. А., Казанцева И. А., Кылычбеков М. Б. // *Бюл. экспер. биол.* — 2008. — № 6. — С. 691—694.

6. Регуляция ангиогенеза при злокачественных новообразованиях почки и мочевого пузыря / Спирина Л. В., Кондакова И. В., Усынин Е. А., Винтизенко С. И. // *Сиб. онкол. журн.* — 2008. — № 4. — С. 65—70.

7. Hoffmann A., Baltimore D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling // *Immunol. Rev.* — 2006. — Vol. 210. — P. 171—186.

8. Van Uden P., Kenneth N. S., Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1α by NF-κappaB // *J. Biochem.* — 2008. — Vol. 412, N 3. — P. 477—484.

9. Sharova N., Zakharova L. Multiple forms of proteasomes and their role in tumor fate // *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery.* — 2008. — Vol. 2, N 3. — P. 152—161.

10. The ubiquitin-proteasome pathway and enhanced activity of NF-κappaB in gastric carcinoma / Wu L., Pu Z., Feng J., Li G., Zheng Z., Shen W. // *J. Surg. Oncol.* — 2008. — Vol. 97, N 5. — P. 439—444.

11. Yue C. X., Ma J., Zhou H. J. The effect of RhoA and proteasome inhibitor MG132 on angiogenesis in tumors // *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* — 2011. — Vol. 42, N 4. — P. 445—501.

12. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis / Maxwell P. H., Wiesener M. S., Chang G. W., Clifford S. C., Vaux E. C., Cockman M. E., Wykoff C. C. // *Nature.* — 1999. — Vol. 399. — P. 271—275.

13. Bortezomib induces nuclear translocation of IκBα resulting in gene-specific suppression of NF-κB-dependent transcription and induction of apoptosis in CTCL / Juvekar A., Manna S., Ramaswami S., Chang T. P., Vu H. Y., Ghosh C. C., Celiker M. Y., Vancurova I. // *Mol. Cancer Res.* — 2011. — Vol. 9, N 2. — P. 183—194.

14. The 20S proteasome processes NF-κappaB1 p105 into p50 in a translation-independent manner / Moorthy A. K., Savinova O. V., Ho J. Q., Wang Y. Y., Vu D., Ghosh G. // *EMBO J.* — 2006. — Vol. 25, N 9. — P. 1945—1956.

15. Множественность форм протеосомы и некоторые подходы к их разделению / Абрамова Е. Б., Астахова Т. М., Ерохов П. А., Шарова Н. П. // *Изв. РАН Сер. биол.* — 2006. — № 2. — С. 150—156.

16. 26S proteasome-mediated production of an authentic major histocompatibility class I-restricted epitope from an intact protein substrate / Ben-Shahar S., Komlosch A., Nadav E., Shaked I., Ziv T., Admon A., DeMartino G. N., Reiss Y. // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274, N 31. — P. 21 963—21 972.

17. Degradation of albumin by renal proximal tubule cells and the subsequent fate of its fragments / Gidehithlu K. P., Pegoraro A. A., Dunea G., Arruda J. A., Singh A. K. // *Kidney International.* — 2004. — Vol. 65. — P. 2113—2122.

18. Schmitz M. L., Bacher S., Kracht M. I kappa B-independent control of NF-κappa B activity by modulatory phosphorylations // *Trends Biochem. Sci.* — 2001. — Vol. 26. — P. 186—190.

19. Proteasome inhibitor PS-341 (bortezomib) induces calpain-dependent IκappaB(α) degradation / Li C., Chen S., Yue P., Deng X., Lonial S., Khuri F. R., Sun S. Y. // *J. Biol. Chem.* — 2010. — Vol. 285, N 21. — P. 16 096—16 104.

20. Goldberg A. L. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy // *Biochem. Society Transactions.* — 2007. — Vol. 35. — P. 12—17.

Поступила 21.02.2012

*Lyudmila Victorovna Spirina¹, Irina Victorovna Kondakova²,
Evgeniy Anatolyevich Usynin³, Zakhar Alexandrovich Yurmazov⁴*

**EXPRESSION REGULATION OF TRANSCRIPTION FACTORS
AND ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR BY PROTEOSOMAL SYSTEM
IN PATIENTS WITH METASTATIC RENAL CARCINOMA**

¹ MD, PhD, Senior Researcher, Tumor Biochemistry Laboratory, Oncology Research Institute,
SD of RAMS (5, Cooperativnaya ul., Tomsk, RF, 634050)

² MD, PhD, DSc, Professor, Head, Tumor Biochemistry Laboratory, Oncology Research Institute,
SD of RAMS (5, Cooperativnaya ul., Tomsk, RF, 634050)

³ MD, PhD, Senior Researcher, General Oncology Department, Oncology Research Institute,
SD of RAMS (5, Cooperativnaya ul., Tomsk, RF, 634050)

⁴ Physician, General Oncology Department, Oncology Research Institute,
SD of RAMS (5, Cooperativnaya ul., Tomsk, RF, 634050)

Address for correspondence: Spirina Lyudmila Victorovna, General Oncology Department,
Oncology Research Institute, SD of RAMS, 5, Cooperativnaya ul., Tomsk, RF, 634050;
e-mail: SpirinaLV@oncology.tomsk.ru

Neoangiogenesis activation associated with elevated levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) under the effect of hypoxia-inducible transcription factor (HIF-1 α) plays an important role in pathogenesis of renal carcinoma. The aim of this study was to analyze expression regulation of HIF-1 α , nuclear transcription factor kappa-B (subunits p65 and p50) and VEGF by proteosomes in tissue of metastatic clear-cell renal-cell carcinoma. Our findings suggest that renal carcinoma is characterized by both enhanced activity of HIF-1 α signaling resulting in VEGF overexpression and of nuclear factor kappa-B pathways, seemingly mediated by proteosomal system. Metastatic carcinomas demonstrated marked decrease in total proteosomal activity as compared to non-metastatic tumors. Levels of VEGF and transcription factors were found to correlate with proteosome activity in clear-cell renal carcinoma tissue. Our findings suggest that proteosomes may be considered a potential mechanism for regulation of neoangiogenesis and metastasis in renal carcinoma tissue.

Key words: renal carcinoma, nuclear transcription factor kappa-B, NF- κ B, hypoxia-inducible transcription factor, HIF-1 α , vascular endothelial growth factor, VEGF, proteosome.

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Валентина Николаевна Кондратова¹, Нина Алексеевна Пирогова²,
Вера Николаевна Степина³, Борис Константинович Подгубный⁴,
Евгений Григорьевич Матякин⁵, Владимир Эдуардович Гурцевич⁶,
Анатолий Владимирович Лихтенштейн⁷

МАРКЕРЫ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА—БАРР ПРИ РАКЕ НОСОГЛОТКИ

¹ Научный сотрудник, лаборатория биохимии опухолей НИИ канцерогенеза
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

² Ведущий программист, Централизованный научно-организационный отдел
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

³ Д. м. н., старший научный сотрудник, лаборатория вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁴ Д. м. н., профессор, заведующий, отделение эндоскопическое НИИ клинической онкологии
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁵ Д. м. н., профессор, заведующий, отделение опухолей верхних дыхательно-пищеварительных путей
НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁶ Д. м. н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий, лаборатория вирусного канцерогенеза
НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁷ Д. б. н., заведующий, лаборатория биохимии опухолей НИИ канцерогенеза
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

Адрес для переписки: 115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24,
лаборатория вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН,
Лихтенштейн Анатолий Владимирович; e-mail: alicht@crc.umos.ru

Основными целями данного исследования были изучение у российских больных раком носоглотки и у пациентов с другими опухолями полости рта (ДОПР) иммунного ответа на внедрение вируса Эпштейна—Барр при одновременном подсчете в плазме крови этих больных числа копий вирусной ДНК и оценка содержания в ней тотальной (геномной) ДНК. В работе использовали плазму крови 26 больных раком носоглотки, 13 больных с другими опухолями полости рта и 50 здоровых лиц. Полимеразную цепную реакцию в реальном времени использовали для количественной оценки вирусных последовательностей в плазме крови, а метод плавления ДНК с высоким разрешением — для оценки полиморфизма полученных в полимеразной цепной реакции ампликонов. Получены следующие результаты: 1) наиболее специфическим маркером рака носоглотки являются повышенные титры IgA антител к капсидному антигену вируса Эпштейна—Барр; 2) повышение концентрации вирусной ДНК в плазме крови характерно как для рака носоглотки, так и для других опухолей полости рта; 3) ни один из исследованных маркеров не обладает 100% чувствительностью; 4) почти у всех больных раком носоглотки уровень хотя бы одного из исследованных маркеров существенно превышает норму, что обуславливает целесообразность применения всей панели для повышения чувствительности диагностики; 5) у ряда онкологических больных ампликоны вирусной ДНК обнаруживают полиморфизм нуклеотидной последовательности.

Ключевые слова: вирус Эпштейна—Барр, рак носоглотки, вирус-специфические антитела, вирусная ДНК, ПЦР в реальном времени, диагностика рака.

Рак носоглотки (РНГ) — одна из форм злокачественных новообразований человека, ассоциированных с вирусной инфекцией [1]. Этиологическим фактором РНГ

признан вирус Эпштейна—Барр (ВЭБ) [2]. Важным средством диагностики и скрининга РНГ, широко применяемым в эндемичных районах (Китай, Тайвань, Гонконг),

является обследование пациентов для выявления в сыворотке крови вирус-специфических антител к ВЭБ [3; 4].

Помимо иммунологической серодиагностики в последние годы активно развивается генетическая серодиагностика, основанная на анализе присутствующих в крови внеклеточных (так называемых циркулирующих) нуклеиновых кислот. Эти молекулы, высвобождающиеся из гибнущих в организме клеток, могут служить маркерами того или иного патологического процесса, в частности опухолевого роста [5—7]. Так, в крови больных РНГ посредством полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) постоянно находят большое число копий вирусной ДНК. Этот количественный метод был эффективно применен для диагностики и мониторинга РНГ, а также для оценки эффективности его лечения [8; 9].

Сопоставление иммунологического и генетического подходов, отражающих разные, но при этом взаимосвязанные стороны патологического процесса (иммунную реакцию организма на инфекцию, с одной стороны, и распад пораженных вирусом клеток, с другой), представляется для указанных выше целей особенно перспективным. Действительно, у больных РНГ между результатами иммунологического и генетического тестирования обнаружена корреляция, хотя в целом значимость ДНК-диагностики (число копий вирусного генома в 1 мл плазмы) оказалась, по данным ряда авторов, существенно выше [10; 11].

Поскольку иммунологические и генетические исследования у больных РНГ проводились исключительно в регионах, эндемичных для этого заболевания, оставалось неясным, существует ли подобная корреляция между показателями иммунологического и генетического тестирования у больных РНГ в неэндемичном регионе, каким является Россия.

Исходя из изложенного целью нашего исследования стало изучение у российских больных РНГ и лиц с ДОПР иммунного ответа на ВЭБ при одновременном подсчете в плазме крови числа копий вирусной ДНК. Кроме того, представлялось важным определить у этих же больных еще один показатель — содержание в плазме крови тотальной геномной ДНК. Для выявления возможной гетерогенности вирусных ампликонов использовали эффективный современный метод плавления ДНК [12].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические образцы

Материалом для исследования служила плазма крови больных, проходивших лечение в ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН: 26 больных с морфологически установленным диагнозом РНГ, 13 больных с опухолями, не локализованными в носоглотке (ДОПР). В качестве контрольных были исследованы образцы плазмы крови 50 здоровых лиц.

Реакция непрямой иммунофлюоресценции

Для определения титра IgG- и IgA-антител к капсидному антигену вируса Эпштейна—Барр (ВКА) использо-

вали клеточную линию РЗНР1, продуцирующую вирус и его капсидный антиген. После обработки клеток индуктором 12-О-тетрадеканойл-форбол-13-ацетатом (20 нг/мл) в течение 3—6 сут в популяции появляется примерно 10% клеток, содержащих антиген. Реакцию непрямой флюоресценции проводили как описано ранее [13].

Выделение циркулирующей ДНК

Кровь (5 мл), собранную в пробирки с ЭДТА, центрифугировали при 1500 g, плазму отбирали и хранили при температуре 60 °С. Образцы объемом 0,5—1,0 мл депротеинизировали фенолом и хлороформом, после чего обессоливали путем диализа или центрифугирования через фильтры «Amicon» (задерживают молекулы массой более 10 кД). Для выделения нуклеиновых кислот из плазмы крови применили оригинальный метод (изотахофорез в агарозном геле), который обеспечивает полное извлечение всех молекул независимо от размера, что особенно важно при исследовании фрагментированной ДНК [14]. Полоску ДНК объемом 10—20 мкл собирали и доводили до 100 мкл раствором ТЕ (10 mM трис-НСl, pH 8, 1 mM ЭДТА). Количество ДНК определяли флуориметрически с красителем SYBR Green I на приборе Plate Reader Chameleon V multilabel counter («Hidex Oy», Финляндия).

ПЦР в реальном времени

Число копий вирусной ДНК в 1 мл плазмы крови определяли посредством ПЦР-РВ. Для построения калибровочных кривых использовали ДНК диплоидных клеток Namalwa, содержащих 2 интегрированных вирусных генома; при этом исходили из соотношения 3,3 пг геномной ДНК — 1 копия вирусной ДНК [15].

Для ПЦР-РВ использовали праймеры к фрагменту размером 76 пар нуклеотидов в области BamHI-W вирусной ДНК (GenBank accession number V01555): sense primer — W-44F (5'-CCCAACACTCCACCACC); antisense primer — W-119R (5'-TCTTAGGAGCTGTCCGAGGG); флуоресцентный зонд W-67T (5'-FAM-CACACACTACACACACCCACCCGTCTC-RTQ1) [8]. В качестве контроля способности ДНК плазмы служить матрицей в ПЦР использовали уникальный ген K-RAS, как описано ранее [16]. Реакцию вели в 96-луночных планшетах на приборе CFX96 («Bio-Rad Laboratories», США) в 50 мкл реакционной смеси («Синтол», Россия), содержащей 0,3 мкМ каждого из праймеров, 25 нМ флуоресцентного зонда, 4 mM MgCl₂, 200 mM каждого дНТФ, 1 ед. Taq-полимеразы, 10 мкл раствора ДНК в буфере ТЕ (соответствует 50 мкл плазмы). В каждый анализ включали 2 негативных контроля (образцы, не содержащие ДНК). Условия ПЦР: денатурация 5 мин при температуре 95 °С; 40 циклов 15 с при температуре 95 °С и 30 с при температуре 56,5 °С. Данные ПЦР-РВ анализировали при помощи программы Bio-Rad CFX manager.

Плавление ДНК

В опытах плавления ампликонов вместо флуоресцентного зонда TaqMan использовали в ПЦР-РВ флуоресцентный краситель EvaGreen («Синтол», Россия), сохраняя прежние условия амплификации (см. выше). После амплификации ДНК прогревали в течение 1 мин при температуре 95 °С, затем 2 мин при 50 °С, после чего плави-

ли от 55 до 90 °С (шаг 0,3 °С, выдержка 12 с). Результаты анализировали с использованием Bio-Rad Precision Melt Analysis software («Bio-Rad Laboratories», США).

Статистический анализ

Содержание тотальной и вирусной ДНК в плазме крови лиц, входящих в состав разных групп, сравнивали посредством непараметрического критерия (U-критерий Манна—Уитни). Рассчитывали точное значение p (различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$). Титры антител представляли в виде их среднегеометрических значений. Статистическую значимость различий частот изучаемых признаков оценивали с помощью критерия χ^2 , для малых выборок рассчитывали точный критерий Фишера. Мету линейной связи оценивали с помощью коэффициента корреляции рангов Спирмена. Вычисления проводили с помощью статистических пакетов «Statistica for Windows, 6.0» и «SPSS».

РЕЗУЛЬТАТЫ

В плазме крови лиц, принадлежащих к одной из 3 сравниваемых групп (здоровые лица, больные РНГ и пациенты с ДОПР), определяли 4 количественных показателя: содержание тотальной ДНК (т. е. геномной, происходящей из распадающихся клеток организма), вирусной ДНК и титры IgG- и IgA-антител к ВКА.

Кривые амплификации вирусной ДНК сдвигаются влево при увеличении ее исходного содержания в образце (рис. 1, А), что объясняется меньшим значением C_t , т. е. того порогового цикла, при котором достигается определенный (превышающий фон) уровень флуоресценции. Линейная зависимость между значением C_t и логарифмом изначально присутствующих в образце копий вирусной ДНК демонстрирует большой динамический интервал (в пределах 4 порядков величины) и высокую степень точности ПЦР-РВ (рис. 1, Б).

Современные приборы ПЦР-РВ позволяют не только количественно оценить число копий последовательности-мишени, присутствующей в исходном образце, но и определить степень гетерогенности ее нуклеотидной последовательности. Полученные ампликоны анализи-

ровали путем плавления в режиме высокого разрешения (High Resolution Melting Analysis, HRMA) — одним из наиболее эффективных методов выявления генных полиморфизмов и мутаций [12]. Неожиданностью явилось то, что профили плавления ампликонов некоторых онкологических больных (как РНГ, так и ДОПР) имеют, в отличие от таковых здоровых лиц, «двугорбую» форму, свидетельствующую, по-видимому, о полиморфизме их нуклеотидной последовательности (рис. 2). Более детальное исследование этого феномена (степень его распространения, возможное влияние на патогенные свойства вируса) — предмет дальнейших исследований.

Между содержанием тотальной и вирусной ДНК в плазме крови испытуемых лиц во всех группах имеется положительная корреляция ($r = 0,9$; $p \leq 0,05$). У онкологических больных повышены оба эти показателя, однако увеличение содержания вирусной ДНК выражено значительно сильнее и статистически значимо ($p < 0,05$; U-критерий Манна—Уитни): концентрация вирусной ДНК увеличивается с 980 копий/мл (межквартильный интервал 100—2300 копий/мл) в группе здоровых лиц до 8300 копий/мл (межквартильный интервал 3300—21000 копий/мл) в группе ДОПР и до 9100 копий/мл (межквартильный интервал 2400—48000 копий/мл) в группе РНГ (см. таблицу). Как и следовало ожидать, вирусная ДНК — более специфичный, чем тотальная ДНК, маркер онкологического процесса, поскольку содержание последней в крови обусловлено суммарным, возникающим в силу множества причин клеточным распадом [17]. При этом следует отметить, что, хотя содержание вирусной ДНК у больных РНГ заметно выше, чем у пациентов с ДОПР (рис. 3), эти различия статистически незначимы.

На рис. 3 представлены титры IgG- и IgA-антител к ВКА, а также содержание вирусной ДНК у здоровых лиц и онкологических больных. Видно, что исследованные показатели претерпевают однотипные изменения: от практически фоновых значений (у здоровых лиц) и несколько его превышающих (у отдельных пациентов с ДОПР) до существенно возрастающих (у больных РНГ). Можно констатировать, что наиболее специфическим

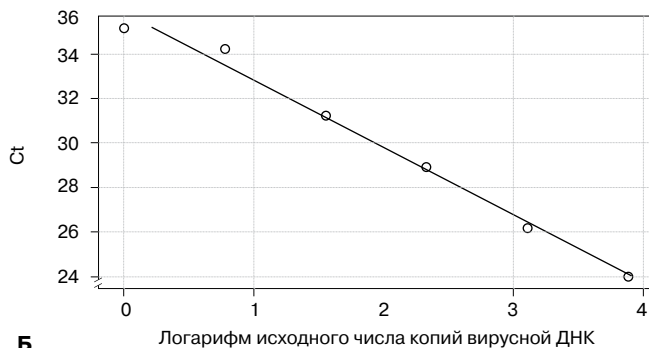
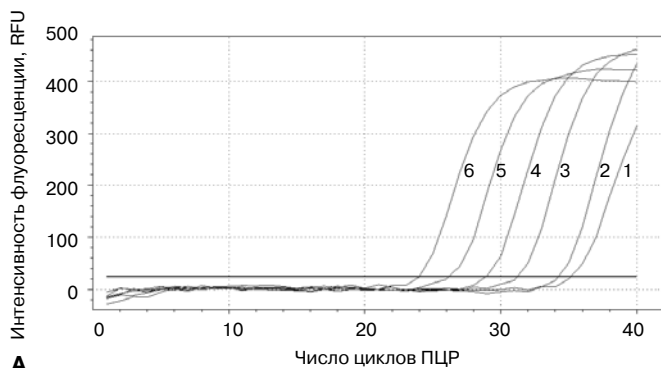


Рисунок 1. Количественная оценка вирусной ДНК методом ПЦР-РВ. Горизонтальная линия обозначает превышающий фон уровень флуоресценции, который используется для определения порогового числа циклов (C_t); RFU — относительные единицы флуоресценции. Эффективность амплификации $E = 97,9\%$, коэффициент корреляции $R^2 = 0,999$. Кривые: 1 — 7 копий вирусного генома; 2 — 38 копий; 3 — 190 копий; 4 — 950 копий; 5 — 4750 копий; 6 — 23 750 копий.

А. Кривые амплификации (зависимость интенсивности флуоресценции от числа циклов ПЦР). **Б.** Линейная зависимость C_t от числа копий вирусной ДНК, изначально присутствующих в образце (в логарифмическом масштабе).

Таблица

Содержание вирусной ДНК и титры IgG- и IgA-антител к ВКА в плазме крови больных раком носоглотки, больных другими опухолями полости рта и здоровых лиц (контроль)

Группы	Число обследованных	Тотальная ДНК, нг/мл		Вирусная ДНК, копии/мл		Титры антител			
		медиана	МКИ	медиана	МКИ	IgG/ВКА		IgA/ВКА	
						СГТ	МКИ	СГТ	МКИ
Контроль	50	51	35—65	980	100—2300	2,3	1—10	1,3	1—1
ДОПР	13	78 ^а	57—111	8300 ^б	3300—21000	39 ^в	20—80	1,5	1—1
РНГ	26	68	29—146	9100 ^б	2400—48000	850 ^{в,г}	640—1280	114 ^а	40—320

МКИ — межквартильный интервал; СГТ — среднегеометрический титр антител.

^а $p < 0,05$ по сравнению с содержанием тотальной ДНК в контрольной группе (U-критерий Манна—Уитни).

^б $p < 0,05$ по сравнению с содержанием вирусной ДНК в контрольной группе (U-критерий Манна—Уитни).

^в $p < 0,05$ по сравнению с частотой IgG/ВКА-положительных случаев в контрольной группе (критерий χ^2).

^г $p < 0,02$ по сравнению с частотой IgG/ВКА-положительных лиц в группе пациентов с ДОПР (критерий χ^2).

^а $p < 0,05$ по сравнению с частотой IgA/ВКА-положительных лиц в контрольной группе и группе пациентов с ДОПР (критерий χ^2).

показателем РНГ являются повышенные по сравнению с таковыми у здоровых лиц и пациентов с ДОПР титры IgA-антител к ВКА ($p < 0,05$; критерий χ^2) (см. таблицу). Повышение титров IgG-антител к ВКА до 320, как и повышение уровня вирусной ДНК (почти до 40 000 копий в 1 мл плазмы), в редких случаях могут наблюдаться и у отдельных пациентов с ДОПР. И то, и другое, по-видимому, объясняется индивидуальными особенностями иммунной реакции организма на растущую в нем опухоль.

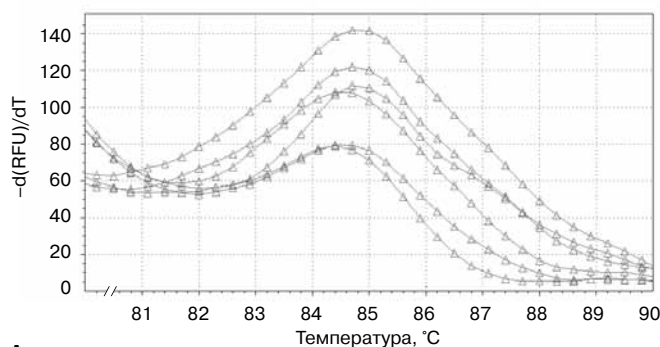
Данные, представленные на рис. 3, свидетельствуют о том, что ни один из исследованных маркеров не обладает 100% чувствительностью в отношении РНГ (уровень любого маркера, будучи повышенным в одном случае, может оказаться в пределах нормы в другом). Поэтому важна оценка диагностической значимости не только индивидуальных маркеров, но и их совокупности. На рис. 4 представлены результаты определения 3 маркеров (IgG- и IgA-антител к ВКА, а также вирусной ДНК) у каждого из обследованных лиц. Оказалось, что у всех 26 больных РНГ, за единственным исключением, хотя бы один из 3 исследованных показателей превышает максимальные

его значения у здоровых лиц и пациентов с ДОПР. Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод, что использование всей панели маркеров может способствовать более надежной диагностике РНГ.

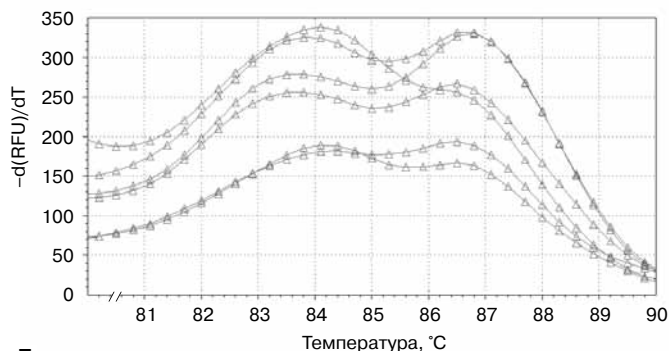
ОБСУЖДЕНИЕ

Сопоставление ряда серологических (иммунологических и генетических) маркеров ВЭБ, предпринятое в данной работе и проведенное на клиническом материале больных РНГ в России, имеет характер пилотного исследования. Иммунологические сдвиги, отмеченные нами у больных с опухолями головы и шеи, соответствуют в основном таковым у больных эндемичных районов. Эти сдвиги проявляются в специфическом для РНГ повышении титров IgA-антител к ВКА (что отмечено у большинства, хотя и не у всех больных) и менее специфическом повышении титра IgG-антител к тому же антигену (у пациентов с ДОПР он возрастает иногда до 320; см таблицу).

Повышенные уровни циркулирующей ДНК в плазме крови онкологических больных, по наблюдениям ряда исследователей, имеют диагностическую значимость,



А



Б

Рисунок 2. Результаты анализа плавления вирусных ампликонов здоровых лиц и онкологических больных. $-d(RFU)/dT$ — отрицательная первая производная кривых плавления.

А. Ампликоны здоровых лиц. **Б.** Ампликоны больных РНГ и лиц с ДОПР.

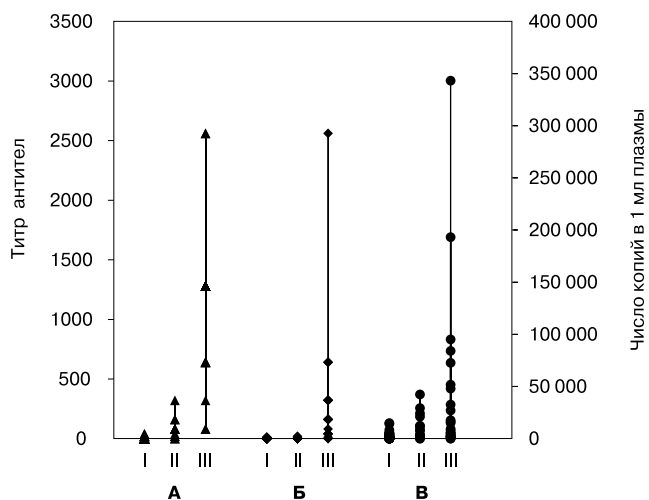


Рисунок 3. Содержание IgG- и IgA-антител к ВКА, а также вирусной ДНК в плазме крови здоровых лиц и онкологических больных. I — здоровые лица (контроль); II — пациенты с ДОПР; III — больные РНГ.
А. IgG. **Б.** IgA. **В.** Копии вирусной ДНК.

т. к., вероятно, отражают растущую массу опухоли [18—21]. Ряд авторов, однако, оспаривают это мнение [22; 23]. Позиции обеих сторон уязвимы для критики, поскольку общепотребительные методы выделения циркулирующей ДНК далеко не количественны [23], а принятый в большинстве работ способ измерений, основанный на ПЦР-РВ, не учитывает сильной фрагментации циркулирующей ДНК и, следовательно, неспособности многих мелких фрагментов участвовать в реакции амплифика-

ции [21; 24]. Ранее нами был разработан количественный метод выделения циркулирующей ДНК (изотахофорез в агарозном геле) [14], что позволило нам более объективно оценить значение этого диагностического показателя. В наших исследованиях у онкологических больных обеих групп (РНГ и ДОПР) отмечено повышение уровня как тотальной, так и вирусной ДНК (см. таблицу). Последнее наблюдение (обнаружение вирусных последовательностей в плазме крови не только больных РНГ, но и у пациентов с ДОПР и даже здоровых лиц) довольно неожиданно. Хотя подобные наблюдения делались и ранее [8; 10], в исследованной нами группе здоровых лиц пропорция «носителей» вирусной циркулирующей ДНК оказалась неожиданно высокой (около 50%). В настоящее время неизвестно, чем объясняется это явление: случайностью ли, обусловленной относительно небольшой выборкой, спецификой генетического и/или иммунного статуса исследованной нами популяции неземлемичного по РНГ региона или же особенностями методического подхода (иным, в частности, чем прежде, и более количественным способом извлечения циркулирующей ДНК). Выяснение как этого вопроса, так и возможности применения данного подхода для мониторинга заболевания и эффективности его лечения, нуждается в дальнейших исследованиях.

Наиболее специфичным в отношении РНГ, судя по нашим данным, являются повышенные титры IgA антител к ВКА (см. таблицу). Однако поскольку этот тест, как и другие, не обладает 100% чувствительностью, представляется оправданным применение всей панели маркеров: IgA- и IgG-антитела к ВКА и вирусная ДНК. Это кажется тем более целесообразным, что появляется возможность дискриминировать разные типы опухолей этой локали-

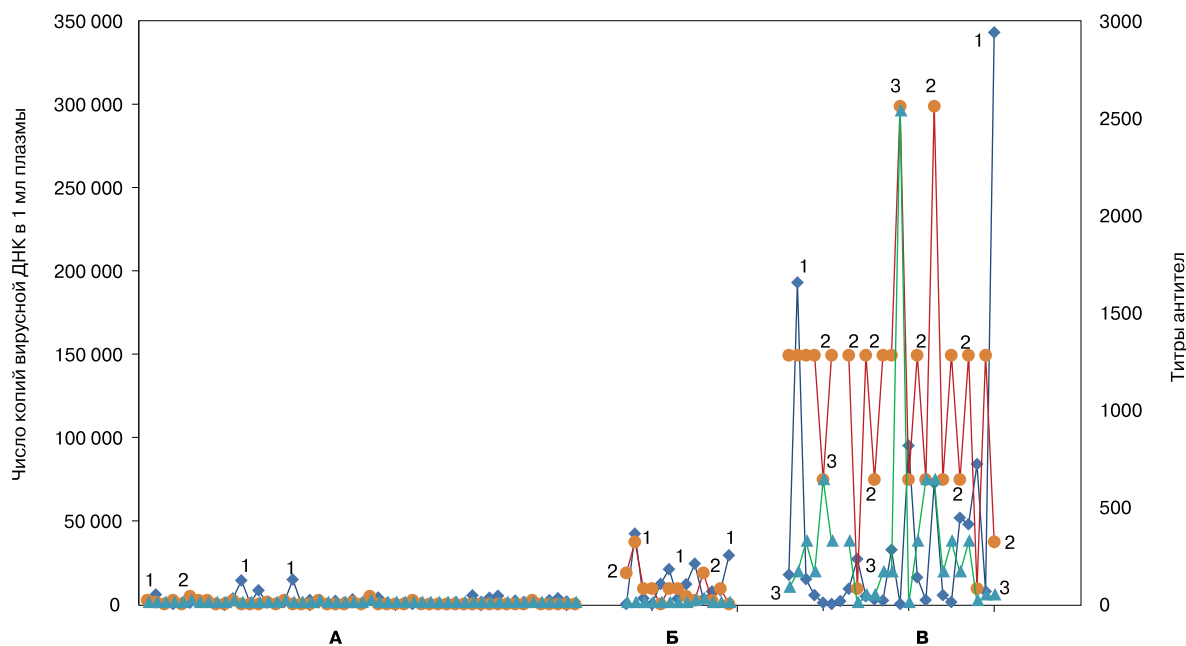


Рисунок 4. Содержание IgG- и IgA-антител к ВКА, а также вирусной ДНК в плазме крови здоровых доноров и онкологических больных (индивидуально). 1 — ВЭБ; 2 — IgG-антитела к ВКА; 3 — IgA-антитела к ВКА.
А. Здоровые лица (контроль). **Б.** Пациенты с ДОПР. **В.** Больные РНГ.

зации: превышение любым из этих показателей фоновых величин должно насторожить врача в отношении возможной опухоли в области головы и шеи, а превышение определенных «пороговых» уровней (IgA/ВКА — > 0, IgG/ВКА — > 320, вирусная ДНК — > 40 000 копий/мл) может указывать на наличие РНГ (см. рис. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В плазме крови онкологических больных (опухоль головы и шеи) статистически значимо повышены титры IgA- и IgG-антител к ВКА, а также содержание вирусной ДНК. Наиболее специфичным для РНГ является повышение титров IgA-антител к ВКА. Поскольку ни один из исследованных маркеров не обладает 100% чувствительностью в отношении РНГ, представляется целесообразным использование всей их панели (практически у каждого больного РНГ хотя бы один из маркеров превышает «пороговый» уровень). У ряда онкологических больных ампликоны вирусной ДНК обнаруживают полиморфизм нуклеотидной последовательности. Это наблюдение нуждается в дальнейшем исследовании, поскольку может иметь отношение к туморогенным свойствам разных изолятов ВЭБ.

Работа поддержана грантом РФФИ (проект №10-04-00060а).

ЛИТЕРАТУРА

- Hildesheim A., Levine P. H. Etiology of nasopharyngeal carcinoma: a review // *Epidemiol. Rev.* — 1993. — Vol. 15. — P. 466—485.
- Genome-wide scan for familial nasopharyngeal carcinoma reveals evidence of linkage to chromosome 4 / Feng B. J., Huang W., Shugart Y. Y., Lee M. K., Zhang F., Xia J. C., Wang H. Y., Huang T. B., Jian S. W., Huang P., Feng Q. S., Huang L. X., Yu X. J., Li D., Chen L. Z., Jia W. H., Fang Y., Huang H. M., Zhu J. L., Liu X. M., Zhao Y., Liu W. Q., Deng M. Q., Hu W. H., Wu S. X., Mo H. Y., Hong M. F., King M. C., Chen Z., Zeng Y. X. // *Nat. Genet.* — 2002. — Vol. 31. — P. 395—399.
- Follow-up studies on Epstein—Barr virus IgA/VCA antibody-positive persons in Zangwu County, China / Zeng Y., Zhong J. M., Li L. Y., Wang P. Z., Tang H., Ma Y. R., Zhu J. S., Pan W. J., Liu Y. X., Wei Z. N. // *Intervirol.* — 1983. — Vol. 20. — P. 190—194.
- Serological diagnosis of nasopharyngeal carcinoma by enzyme linked immunosorbent assay: optimization, standardization and diagnostic criteria / Ng M. H., Chen H. L., Luo R. X., Chan K. H., Woo P. C., Sham J. S., Huang J., Seto W. H., Smith P., Griffin B. E. // *Chin. Med. J. (Engl.)*. — 1998. — Vol. 111. — P. 531—536.
- Circulating nucleic acids and apoptosis / Lichtenstein A. V., Melkonyan H. S., Tomei L. D., Umansky S. R. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2001. — Vol. 945. — P. 239—249.
- Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer // *Nat. Rev. Cancer.* — 2002. — Vol. 2. — P. 210—219.
- Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation / Skvortsova T. E., Rykova E. Y., Tamkovich S. N., Bryzgunova O. E., Starikov A. V., Kuznetsova N. P., Vlassov V. V., Laktionov P. P. // *Br. J. Cancer.* — 2006. — Vol. 94. — P. 1492—1495.
- Quantitative analysis of cell-free Epstein—Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma / Lo Y. M., Chan L. Y., Lo K. W., Leung S. F., Zhang J., Chan A. T., Lee J. C., Hjelm N. M., Johnson P. J., Huang D. P. // *Cancer Res.* — 1999. — Vol. 59. — P. 1188—1191.
- Epstein—Barr virus DNA in serum/plasma as a tumor marker for nasopharyngeal cancer / Shotelersuk K., Khorprasert C., Sakdikul S.,

Pornthanakasem W., Voravud N., Mutirangura A. // *Clin. Cancer Res.* — 2000. — Vol. 6. — P. 1046—1051.

10. Comparison of plasma Epstein—Barr virus (EBV) DNA levels and serum EBV immunoglobulin A/virus capsid antigen antibody titers in patients with nasopharyngeal carcinoma / Shao J. Y., Li Y. H., Gao H. Y., Wu Q. L., Cui N. J., Zhang L., Cheng G., Hu L. F., Ernberg I., Zeng Y. X. // *Cancer.* — 2004. — Vol. 100. — P. 1162—1170.

11. Comparison of the prognostic impact of serum anti-EBV antibody and plasma EBV DNA assays in nasopharyngeal carcinoma / Twu C. W., Wang W. Y., Liang W. M., Jan J. S., Jiang R. S., Chao J., Jin Y. T., Lin J. C. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* — 2007. — Vol. 67. — P. 130—137.

12. Erali M., Wittwer C. T. High resolution melting analysis for gene scanning // *Methods.* — 2010. — Vol. 50. — P. 250—261.

13. Гуморальный иммунный ответ к вирусу Эпштейна—Барр в диагностике рака носоглотки (обзор литературы и 30-летний опыт собственных исследований) / Гурцевич В. Э., Степина В. Н., Сенюта Н. Б., Гончарова Е. В., Щербак Л. Н., Душенькина Т. Е., Репкина И. А., Белоусова Н. В., Кондратьева Т. Т., Алиева С. Б., Ахундов А. А., Матякин Е. Г., Поддубный Б. К., Пробатова Н. А., Пачес А. И. // *Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН.* — 2011. — № 22. — С. 20—29.

14. Tube gel isotachopheresis: A method for quantitative isolation of nucleic acids from diluted solutions / Kondratova V. N., Botezatu I. V., Shelepov V. P., Lichtenstein A. V. // *Anal. Biochem.* — 2011. — Vol. 408. — P. 304—308.

15. Lawrence J. B., Villave C. A., Singer R. H. Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line // *Cell.* — 1988. — Vol. 52. — P. 51—61.

16. DNA melting analysis: Application of the «open tube» format for detection of mutant KRAS / Botezatu I. V., Kondratova V. N., Shelepov V. P., Lichtenstein A. V. // *Anal. Biochem.* — 2011. — Vol. 419. — P. 302—308.

17. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantifications and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells / Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayer F. O., Hesch R. D., Knippers R. // *Cancer Res.* — 2001. — Vol. 61. — P. 1659—1665.

18. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer / Sozzi G., Conte D., Leon M., Ciricione R., Roz L., Rattcliffe C., Roz E., Cirenei N., Bellomi M., Pelosi G., Pierotti M. A., Pastorino U. // *J. Clin. Oncol.* — 2003. — Vol. 21. — P. 3902—3908.

19. Taback B., O'Day S. J., Hoon D. S. Quantification of circulating DNA in the plasma and serum of cancer patients // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2004. — Vol. 1022. — P. 17—24.

20. Quantification of total plasma cell-free DNA in ovarian cancer using real-time PCR / Kamat A. A., Sood A. K., Dang D., Gershenson D. M., Simpson J. L., Bischoff F. Z. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2006. — Vol. 1075. — P. 230—234.

21. High Fragmentation Characterizes Tumour-Derived Circulating DNA / Moulriere F., Robert B., Arnau Peyrotte E., Del Rio M., Ychou M., Molina F., Gongora C., Thierry A. R. // *PLoS One.* — 2011. — Vol. 6. — P. e23418.

22. Quantitative analysis of circulating plasma DNA as a tumor marker in thoracic malignancies / Herrera L. J., Raja S., Gooding W. E., El-Hefnawy T., Kelly L., Luketich J. D., Godfrey T. E. // *Clin. Chem.* — 2005. — Vol. 51. — P. 113—118.

23. Improved method for isolating cell-free DNA / Schmidt B., Weickmann S., Witt C., Fleischhacker M. // *Clin. Chem.* — 2005. — Vol. 51. — P. 1561—1563.

24. Novel applications of polymerase chain reaction to urinary nucleic acid analysis / Lichtenstein A. V., Melkonyan H. S., Tomei L. D., Umansky S. R. // *Methods Mol. Biol.* — 2006. — Vol. 336. — P. 145—154.

Поступила 03.02.2012

*Valentina Nikolayevna Kondratova¹, Nina Alexeyevna Pirogova²,
Vera Nikolayevna Stepina³, Boris Konstantinovich Poddubny⁴,
Evgeniy Grigorievich Matyakin⁵, Vladimir Eduardovich Gurtsevich⁶,
Anatoliy Vladimirovich Lichtenshtein⁷*

EPSTEIN—BARR VIRUS MARKERS IN PATIENTS WITH NASOPHARYNGEAL CARCINOMA

¹ MSc, Researcher, Tumor Biochemistry Laboratory, Carcinogenesis Research Institute,
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

² Leading Programmer, Centralized Research Organization Department, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center,
RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

³ MD, PhD, DSc, Senior Researcher, Viral Carcinogenesis Laboratory, Carcinogenesis Research Institute,
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁴ MD, PhD, DSc, Professor, Head, Endoscopy Department, Clinical Oncology Research Institute,
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁵ MD, PhD, DSc, Professor, Head, Upper Respiratory and Digestive Tract Tumor Department, Clinical Oncology Research
Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁶ MD, PhD, DSc, Professor, RF Honored Scientist, Head, Viral Carcinogenesis Laboratory, Carcinogenesis Research Institute,
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁷ MSc, PhD, DSc, Head, Tumor Biochemistry Laboratory, Carcinogenesis Research Institute,
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

Address for correspondence: Lichtenshtein Anatoliy Vladimirovich, Viral Carcinogenesis Laboratory, Carcinogenesis
Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS, 24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478;
e-mail: alicht@crc.umos.ru

The purpose of this study was to assess immune response to Epstein—Barr virus, to count total (genomic) and viral DNA copy numbers in blood plasma samples from patients with nasopharyngeal carcinoma and patients with other oral tumors. Blood plasma was collected from 26 nasopharyngeal carcinoma patients, 13 patients with other oral tumors and 50 healthy individuals. Real-time polymerase chain reaction was used to quantify viral DNA sequences and high resolution DNA melting was used to assess viral amplicon gene polymorphism. Our findings were as follows: 1) elevated IgA titers of antibody to Epstein—Barr virus capsid antigen were the most specific marker of nasopharyngeal carcinoma; 2) increased plasma viral DNA concentration was characteristic of both nasopharyngeal carcinoma and other oral tumors; 3) none of the markers studied demonstrated a 100% sensitivity; 4) practically every patient with nasopharyngeal carcinoma demonstrated a higher than normal level of at least one of the markers that suggested the need to use the entire panel to improve the test sensitivity; and 5) high resolution DNA melting analysis detected genetic polymorphism of viral amplicons in some of the patients with nasopharyngeal carcinoma and other oral tumors.

Key words: Epstein—Barr virus, nasopharyngeal carcinoma, virus-specific antibody, viral DNA, real-time PCR, cancer diagnosis.

Татьяна Федоровна Маливанова¹, Валентина Александровна Юрченко²,
Елена Викторовна Скоромыслова³, Наталья Николаевна Мазуренко⁴

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА -308(G/A)TNF НА ОБЩУЮ ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹ К. м. н., старший научный сотрудник, лаборатория онкогеномики НИИ канцерогенеза
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

² К. м. н., старший научный сотрудник, отдел эпидемиологии опухолей НИИ канцерогенеза
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

³ Лаборант-исследователь, лаборатория онкогеномики НИИ канцерогенеза
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁴ Д. б. н., профессор, заведующая, лаборатория онкогеномики НИИ канцерогенеза
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

Адрес для переписки: 115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, лаборатория онкогеномики
НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН, Маливанова Татьяна Федоровна;
e-mail: tmalivanova@yandex.ru

Фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF) — воспалительный цитокин, вовлеченный в развитие и прогрессирование злокачественных новообразований. В промоторной области гена *TNF* находится сайт -308(G/A)TNF, замена в котором влияет на уровень транскрипции гена. Задачей исследования являлось изучение прогностической значимости полиморфизма -308(G/A)TNF при раке молочной железы. Методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции исследованы 260 первичных больных раком молочной железы без отдаленных метастазов. Аллель -308(A)TNF, связанный с повышенным уровнем транскрипции, обнаружен у 25,8% больных раком молочной железы. Установлено, что в группе больных с III стадией заболевания общая выживаемость для носителей -308(A)TNF значительно выше, чем у носителей гомозигот по аллелю -308(G)TNF (5-летняя выживаемость 100 и 52,4 ± 6,9% соответственно; $p = 0,002$, критерий log-rank). Полученные данные позволяют рассматривать полиморфизм -308(G/A)TNF промоторной области гена *TNF* как возможный дополнительный прогностический признак при раке молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, фактор некроза опухоли TNF, геномный полиморфизм, общая выживаемость.

Фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF, TNF α) — воспалительный цитокин, который принимает участие в широком спектре биологических процессов в организме. Большой объем экспериментальных данных демонстрирует, в том числе на клеточных линиях рака молочной железы (РМЖ) человека, вовлеченность TNF в развитие и прогрессирование злокачественных новообразований [1]. Действие TNF опосредуется его рецепторами, и эффекты активируемых сигнальных каскадов могут быть диаметрально противоположными. TNF способен индуцировать как апоптоз, так и пролиферацию опухолевых клеток; он вызывает как сосудистый коллапс (приводя к некрозу опухоли), так и неоангиогенез; является индуктором инициально-мезенхимального перехода, способствуя инвазии и метастазированию. Ген *TNF* располагается на 6-й хромосоме в области генов HLA

III класса (6p21.3). В промоторной области гена *TNF* находится ряд сайтов однонуклеотидных замен, среди которых наиболее изучен 308(G/A)TNF [2]. В экспериментах *in vitro* показано, что замена гуанина на аденин в положении -308 п.н. приводит к повышению уровня транскрипции гена TNF от 2,5 [3] до 6—9 раз [2]. Полиморфизм этого сайта связывают с рядом инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний [4].

Ранее мы изучали распределение аллелей -308(G/A)TNF и микросателлитного маркера TNF α в зависимости от клинико-морфологических особенностей РМЖ. Мы не обнаружили ассоциации -308(G/A)TNF с развитием спорадического РМЖ, однако нам впервые удалось показать ассоциацию полиморфизма области гена *TNF* с наследственным характером заболевания [5], гистологическим типом [6] и рецепторным статусом опухоли [7]. В последние годы появились работы, в которых методом метаанализа 10 000 случаев выявлена ассоциация с РМЖ низкоэкспрессирующего аллеля -308(G)TNF [8, 9].

Данные литературы о прогностической значимости полиморфизма *-308(G/A)TNF* для этого онкологического заболевания ограничены, поэтому задачей нашего исследования явилось изучение зависимости общей выживаемости (ОВ) больных РМЖ от полиморфизма *-308(G/A)TNF*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали коллекцию геномной ДНК, полученной от 260 больных первичным спорадическим РМЖ без отдаленных метастазов (M0), госпитализированных в РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН в 2003—2004 гг. Все больные получали лечение в соответствии со стадией и с клинико-морфологическими характеристиками заболевания. Средний возраст больных составил 54,9 года (от 23 до 78 лет). По рецепторному статусу 60,6% опухолей экспрессировали рецепторы эстрогена (РЭ+), 48,6% — рецепторы прогестерона (РП+). По гистологическому типу 69,6% опухолей относились к инфильтративно-протоковому, 24,6% — к инфильтративно-дольковому, 5,8% — к смешанному типу РМЖ (при наличии как протокового, так и долькового компонента).

Образцы геномной ДНК были выделены из лейкоцитов венозной крови с использованием протеиназы-К с последующей фенольно-хлороформной экстракцией и осаждением этанолом. Анализ полиморфизма *-308(G/A)TNF* проводили методом полимеразной цепной реакции с применением аллель-специфических праймеров: 5'-tctcggtttctctccatcg-3' (antisense), 5'-atagggtttgaggggatcg-3' (primer G sense), 5'-aatagggtttgaggggatcg-3' (primer A sense) с последующим разделением продуктов реакции в 2% агарозном геле [6]. Распространенность генотипов *-308(G/A)TNF* сравнивали с помощью точного двустороннего критерия Фишера. Для проверки согласия распределения генотипов с распределением, равновесным по Харди—Вайнбергу, использовали критерий χ^2 . Критерием оценки прогностической значимости изучаемого полиморфизма являлись показатели общей выживаемости (ОВ). Оценку ОВ проводили по методу Каплана—Майера с применением критерия log-rank в программе «GraphPad Prism» (версия 4.00). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В анализируемой выборке минорный аллель *-308(A)TNF* был обнаружен в качестве гомозиготы у 2 (0,8%) женщин, гетерозиготы — у 65 (25%); 193 (74,2%) больных являлись носителями гомозигот по аллелю *-308(G)TNF*. Полученное распределение генотипов не отличалось от ожидаемого распределения Харди—Вайнберга ($p = 0,2$), как и от распределения генотипов, полученного нами ранее для контрольной группы [7] ($p = 0,6$). Поскольку число гомозигот по аллелю *-308(A)TNF* было мало, больные были разделены на 2 группы: «aa/ag» — группа женщин, в геноме которых обнаружен хотя бы один аллель *-308(A)TNF*, «gg» — группа носителей гомозигот по аллелю *-308(G)TNF*. Таким образом, у 25,8% больных РМЖ имелся генотип aa или ag и у 74,2% — генотип gg.

В обеих группах опухоли РЭ+ встречались примерно с одинаковой частотой (59% — для генотипа aa/ag,

61,2% — для генотипа gg; $p = 0,8$), как и опухоли РП+ (47,4% — для генотипа aa/ag, 49,1% — для генотипа gg; $p = 0,9$). Опухоли с инфильтративно-протоковым гистологическим типом несколько чаще встречались у больных с генотипом gg (72,5%), чем у женщин с генотипом aa/ag (61,2%; $p = 0,09$).

Распределение больных РМЖ в соответствии со стадиями заболевания и с классификацией TNM представлено на рис. 1. Частота выявления генотипа aa/ag в выделенных группах статистически значимо не различалась и варьировала от 17,6 до 30,2% (см. рис. 1).

При анализе кривых ОВ для всей выборки статистически значимых различий между группами больных с генотипами aa/ag и gg не обнаружено ($p = 0,2$, критерий log-rank) (рис. 2, А). В группе носителей генотипа aa/ag 5-летняя ОВ была несколько выше ($89,3 \pm 3,9\%$), чем у носителей генотипа gg ($82,7 \pm 2,8\%$), но различия не были статистически значимыми. При разделении выборки в соответствии с рецепторным статусом и гистологическим типом опухоли статистически значимых различий по ОВ между носителями генотипов aa/ag и gg также не выявлено (данные не представлены).

Для больных с I и со II стадиями заболевания (независимо от генотипа *-308(G/A)TNF*), как и для носителей генотипа aa/ag с III стадией заболевания, кривые ОВ не опускались ниже уровня 83% (рис. 2, Б). При III стадии РМЖ кривые ОВ для носителей генотипа aa/ag располагались статистически значимо выше, чем для носителей генотипа gg (5-летняя ОВ 100% и $52,4 \pm 6,9\%$, соответственно; $p = 0,002$, критерий log-rank) (см. рис. 2, Б). Аналогично выглядели кривые ОВ при разделении выборки по размеру опухоли (T) и вовлеченности лимфатических узлов (N): для носителей генотипов aa/ag и gg с опухолями T3—4 5-летняя ОВ составляет $93,8 \pm 6,1$ и $48,6 \pm 8,5\%$ соответственно ($p = 0,004$, критерий log-rank; рис. 2, В), при опухолях N2—3 — 100% для носителей генотипа aa/ag и $38,1 \pm 9,6\%$ для носителей генотипа gg ($p = 0,02$, генотипа; рис. 2, Г).

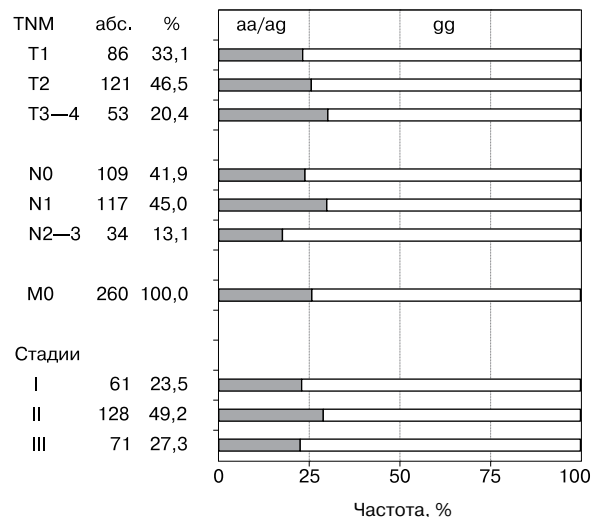


Рисунок 1. Распределение больных РМЖ в зависимости от стадии заболевания и распространенности генотипов aa/ag и gg *-308(G/A)TNF*.

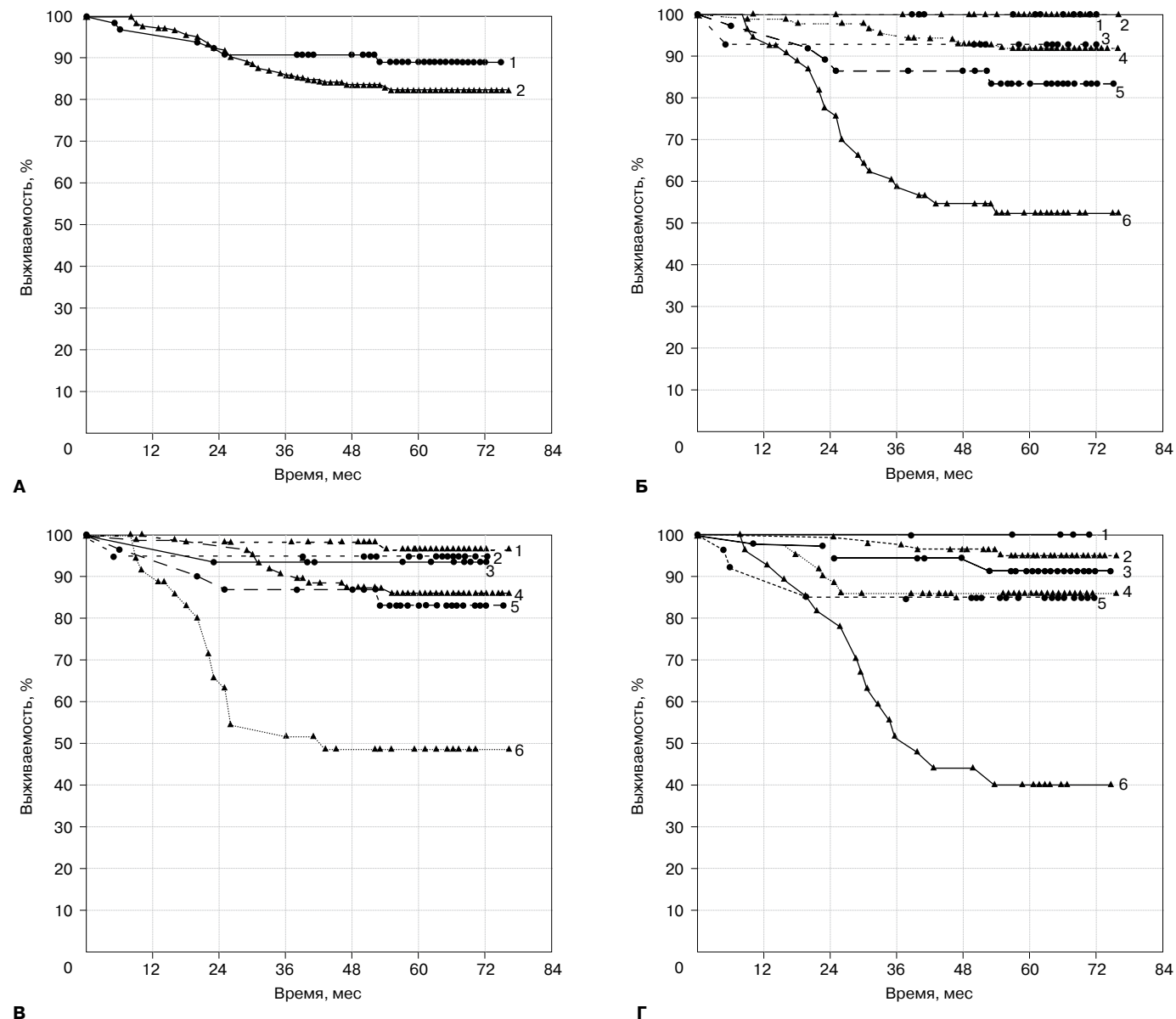


Рисунок 2. Зависимость ОВ больных РМЖ от полиморфизма -308(G/A)TNF.
А. Для всей выборки ($p = 0,02$). 1. — aa/ag; 2 — gg. **Б.** В зависимости от стадий заболевания ($p < 0,0001$). 1. — aa/ag, III—IV стадии; 2 — gg, I стадия; 3 — aa/ag, I стадия; 4 — gg, II стадия; 5 — aa/ag, II стадия; 6 — gg, III—IV стадии. **В.** В зависимости от размера опухоли ($p < 0,0001$). 1 — gg, T1; 2 — aa/ag, T1; 3 — aa/ag, T3—4; 4 — gg, T2; 5 — aa/ag, T2; 6 — gg, T3—4. **Г.** В зависимости от состояния лимфатических узлов ($p < 0,0001$). 1. — aa/ag, N2—3; 2 — gg, N0; 3 — aa/ag, N1; 4 — gg, N1; 5 — aa/ag, N0; 6 — gg, N3—3.

Таким образом, наличие аллеля -308(A)TNF может являться фактором, повышающим выживаемость при РМЖ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Попытки определить диагностическую и/или прогностическую значимость TNF для РМЖ позволили выявить повышенный уровень этого цитокина как в сыворотке крови больных [10, 11], так и в опухолевой ткани [12, 13]. Повышенный уровень TNF был ассоциирован с поздними стадиями заболевания [11], отрицательным рецепторным статусом [12] и инфильтративно-дольковым

типом опухоли [13]. Ранее мы обнаружили статистически значимое увеличение частоты высокоэкспрессирующего генотипа aa/ag в группе больных с инфильтративно-дольковым по сравнению с таковой у пациентов с инфильтративно-протоковым гистологическим типом РМЖ ($p = 0,04$) в выборке из 167 больных РМЖ [6]. При расширении этой выборки до 260 больных в представленной работе полученное различие в 11% случаев теряет статистическую значимость ($p > 0,05$). Однако следует рассматривать подобную тенденцию как важную биологическую характеристику, так как состав экспрессируемых генов в значительной мере отличается от такового

для инфильтративно-долькового и инфильтративно-протокового типов опухоли [14].

Приведенные выше данные литературы демонстрируют ассоциацию TNF с развитием РМЖ. В то же время повышение уровня экспрессии воспалительного цитокина может отражать интенсивность реакции организма на наличие опухолевого процесса, т. е. проявление противоопухолевого действия TNF. Известен ряд механизмов противоопухолевого эффекта TNF: прямое цитотоксическое действие на опухолевые клетки, индукция геморагического некроза опухоли, стимуляция противоопухолевого иммунитета, а также синергичность действия с противоопухолевыми препаратами [15]. Поскольку в эксперименте эти процессы зависят от дозы индуктора, можно предполагать, что на них способен влиять полиморфизм промоторной области гена, регулирующий уровень экспрессии эндогенного TNF.

Известно, что геномный полиморфизм имеет этногеографические особенности. Ch. Shen и соавт. [8] сделали вывод, что аллель *-308(A)TNF* может быть важным защитным фактором для европейцев, однако для африканских арабов (Северная Африка, Тунис) генотип, содержащий гомозиготу этого аллеля, является фактором риска развития РМЖ. В то же время исследование тунисской популяции показало статистически значимое снижение общей и безрецидивной выживаемости для носителей гомозиготы *-308(A)TNF* [16]. Однако наши результаты свидетельствуют о том, что наличие аллеля *-308(A)TNF* существенно повышает ОВ больных РМЖ III стадии. Необходимо отметить, что обе женщины, гомозиготные по аллелю *-308(A)TNF*, были живы по истечении периода наблюдения (61 и 67 мес). Таким образом, наблюдается разнонаправленное влияние полиморфизма *-308(G/A)TNF* на возникновение и прогноз РМЖ в разных национальных группах.

При изучении американской популяции (без указания этнической принадлежности) А. DeMichel и соавт. [17] не обнаружили различий по 4-летней ОВ больных РМЖ между носителями аллеля *-308(A)TNF* и в отсутствие этого аллеля. Авторы не разделяли выборку по стадиям заболевания, но у всех больных имелись метастазы в 4 регионарных лимфатических узлах и более (т. е. статус N2—3). В противоположность этому для российских больных мы находим статистически значимое повышение ОВ для носителей генотипа aa/ag в группе со статусом N2—3, как и в группе больных РМЖ III стадии, что также может объясняться различием в национальном составе исследуемых популяций.

Мы впервые показали зависимость ОВ от полиморфизма *-308(G/A)TNF* для российской популяции, причем такая зависимость оказалась критичной только для поздних стадий заболевания. Возможно, это связано с тем, что относительно невысокая распространенность генотипа aa/ag (около 1/4 больных) в сочетании с высокой ОВ для I и II стадий РМЖ (5-летняя ОВ 98,4 ± 1,6 и 89,4 ± 2,8% соответственно) не позволяет выявить ассоциацию полиморфизма на ранних стадиях заболевания. В то же время мы наблюдаем значительные различия почти 50% по 5-летней ОВ между группами носителей генотипов aa/ag и gg для больных РМЖ II стадии. Создается впечатление, что в отношении ОВ генотип aa/ag «снижает» степень

агрессивности заболевания и у больных РМЖ III стадии с таким генотипом ОВ повышается до уровня ОВ у больных с I—II стадиями заболевания. Можно предположить, что низкоэкспрессирующий генотип gg не обеспечивает необходимого уровня эндогенного TNF, в то время как высокоэкспрессирующий генотип aa/ag, по-видимому, способен реализовать противоопухолевый эффект TNF на поздних стадиях заболевания.

Мы не обнаружили для носителей генотипов aa/ag и gg статистически значимых различий по клинико-морфологическим характеристикам (экспрессия РЭ, РП и гистологический тип опухоли), способным повлиять на выбор проводившегося лечения. Поскольку распространенность этих генотипов примерно одинаковая для всех стадий (см. рис. 1), то повышение ОВ у носителей генотипа aa/ag с III стадией РМЖ может быть обусловлено большей чувствительностью к терапии, предусмотренной для поздних стадий этого онкологического заболевания.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что полиморфизм *-308(G/A)TNF* может быть использован как дополнительный прогностический фактор при III стадии РМЖ. Наши дальнейшие исследования будут направлены на выяснение зависимости чувствительности к проводимой терапии от функционально значимых полиморфизмов промоторной области гена *TNF*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Balkwill L. TNF- α in promotion and progression of cancer // *Cancer Metastasis Rev.* — 2006. — Vol 25. — P. 409—416.
2. Hajeer A. H., Hutchinson I. V. Influence of TNF α gene polymorphisms on TNF α production and disease // *Human Immunol.* — 2001. — Vol. 62. — P. 1191—1199.
3. A critical assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: a reassessment of -308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter system / Karimi M., Goldie L. C., Cruickshank M. N., Moses E. K., Abraham L. J. // *Eur. J. Human Genet.* — 2009. — Vol. 17. — P. 1454—1462.
4. Tumor necrosis factor alpha -308 gene locus promoter polymorphism: An analysis of association with health and disease / Elahi M. M., Asotra K., Matata B. M., Mastana S. S. // *Biochimica et Biophysica Acta.* — 2009. — Vol. 1792. — P. 163—172.
5. Полиморфизм в локусе гена фактора некроза опухолей при спорадическом и наследственном раке молочных желез / Маливанова Т. Ф., Осташкин А. С., Юрченко В. А., Мазуренко Н. Н. // *Вопр. онкол.* — 2007. — Т. 53, № 6. — С. 664—667.
6. Полиморфизм в локусе гена фактора некроза опухолей у больных раком молочной железы / Осташкин А. С., Маливанова Т. Ф., Юрченко В. А., Мазуренко Н. Н. // *Генетика.* — 2008. — Т. 44, № 9. — С. 1275—1280.
7. Генетические маркеры локуса гена фактора некроза опухолей (TNF): ассоциация с рецепторным статусом рака молочной железы / Маливанова Т. Ф., Осташкин А. С., Юрченко В. А., Герштейн Е. С., Чуев Ю. В., Мазуренко Н. Н. // *Молекул. мед.* — 2009. — № 3. — С. 18—23.
8. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and breast cancer risk: a meta-analysis / Shen Ch., Sun H., Sun D., Xu L., Zhang X., Liu A., Jia X., Bai J., Chen F., Yu Y., Jin Y., Yu J., Fu S. // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2011. — Vol. 126, N 3. — P. 763—770.
9. TNF α -308 G/A polymorphism is associated with breast cancer risk: a meta-analysis involving 10,184 cases and 12,911 controls / Fang F., Yao L., Yu X. J., Yu L., Wu Q., Yu L. // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2010. — Vol. 122, N 1. — P. 267—271.
10. Polymorphisms in cytokine genes and serum cytokine levels among New Mexican women with and without breast cancer / Erdei E., Kang A., Meisner A., White K., Pickett G., Baca C., Royce M., Berwick M. // *Cytokine.* — 2010. — Vol. 51. — P. 18—24.

11. Significance of serum tumor necrosis factor-alpha and its combination with HER-2 codon 655 polymorphism in the diagnosis and prognosis of breast cancer / Papadopoulou E., Tripsianis G., Anagnostopoulos K., Tentes I., Kakolyris S., Galazios G., Sivridis E., Simopoulos K., Kortsaris A. // *Int. J. Biol. Markers*. — 2010. — Vol. 25, N 3. — P. 126—135.

12. Oestrogen receptor negative breast cancer exhibit high cytokine content [Электронный ресурс] / Chavey C., Bibeau F., Gourgou-Bourgade S., Burlinon S., Boissiere F., Laune D., Roques S., Lazennec G. // *Breast Cancer Res*. — 2007. — Vol. 9, N 1. — R 15. — URL: <http://breast-cancer-research.com/content/9/1/R15> (дата обращения: 10.01.2012).

13. Role of tumor necrosis factor- α and its receptors in human benign breast lesions and tumors (in situ and infiltrative) / Garcia-Tuñón I., Ricote M., Ruiz A., Fraile B., Paniagua R., Royuela M. // *Cancer Sci*. — 2006. — Vol. 97, N 10. — P. 1044—1049.

14. Lobular and ductal carcinomas of the breast have distinct genomic and expression profiles / Bertucci F., Orsetti B., Nègre V., Finetti P., Rougé C., Ahomadegbe J.-Ch., Bibeau F., Mathieu M.-Ch., Treilleux I., Jacquemier J., Ursule L., Martinec A., Wang Q., Bénard J., Puisieux A.,

Birnbaum D., Theillet Ch. // *Oncogene*. — 2008. — Vol. 27, N 40. — P. 5359—5372.

15. Bertazza L., Mocellin S. The Dual Role of Tumor Necrosis Factor (TNF) in Cancer Biology // *Current Med. Chem*. — 2010. — Vol. 17. — P. 3337—3352.

16. Genetic variation in the tumor necrosis factor alpha promoter region and in the stress protein hsp70-2: susceptibility and prognostic implications in breast carcinoma / Mestiri S., Bouaouina N., Ahmed S. B., Khedhaier A., Jrad B. B., Remadi S., Chouchane L. // *Cancer*. — 2001. — Vol. 91. — P. 672—678.

17. Interleukin-6 -174G©C Polymorphism Is Associated with Improved Outcome in High-Risk Breast Cancer / DeMichele A., Martin A.-M., Mick R., Gor P., Wray L., Klein-Cabral M., Athanasiadis G., Colligan T., Stadtmauer E., Weber B. // *Cancer Res*. — 2003. — Vol. 63. — P. 8051—8056.

Поступила 18.01.2012

*Tatyana Feodorovna Malivanova*¹, *Valentina Alexandrovna Yurchenko*²,
*Elena Victorovna Skoromyslova*³, *Natalia Nikolayevna Mazurenko*⁴

-308(G/A)TNF POLYMORPHISM INFLUENCES OVERALL SURVIVAL OF BREAST CANCER PATIENTS

¹ MD, PhD, Senior Researcher, Oncogenomics Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

² MD, PhD, Senior Researcher, Tumor Epidemiology Department, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

³ Laboratory Assistant, Oncogenomics Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁴ MSc, PhD, DSc, Professor, Head, Oncogenomics Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

Address for correspondence: Malivanova Tatyana Feodorovna, Oncogenomics Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS, 24, Kashirskoye sh., Moscow, 115478, RF; e-mail: tmalivanova@mail.ru

TNF is an inflammatory cytokine involved in development and progression of malignancies. Promoter single nucleotide polymorphism influences the level of TNF transcription. Low expression of allele -308(G) TNF is associated with breast cancer. The purpose of this study was to analyze prognostic significance of -308(G/A)TNF polymorphism in breast carcinoma. Retrospective analysis was carried out in 260 breast cancer patients free from distant metastasis. -308(G/A)TNF polymorphism was detected by allele specific polymerase chain reaction. We found that overall survival of stage III patients was significantly higher in the presence of -308(G)TNF allele than in homozygous -308(G)TNF genotype (5-year overall survival 100% and 52.4 ± 6.9%, respectively; logrank test p = 0.002). This study suggests that -308(G/A)TNF polymorphism may be an additional prognostic factor in breast carcinoma.

Key words: breast cancer, tumor necrosis factor TNF, polymorphism, overall survival.

Дмитрий Алексеевич Шаповалов¹, Валентина Михайловна Нечушкина²,
Игорь Геннадьевич Комаров³, Артем Вячеславович Налбандян⁴

СЕЛЕКТИВНАЯ ТАЗОВАЯ ЛИМФАДЕНЭКТОМИЯ ПРИ РАКЕ ТЕЛА МАТКИ

¹ Научный сотрудник, хирургическое отделение опухолей женской репродуктивной системы НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

² К. м. н., старший научный сотрудник, гинекологическое отделение НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

³ Д. м. н., профессор, ведущий научный сотрудник, хирургическое отделение диагностики опухолей НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁴ К. м. н., доцент, кафедра онкологии ФУВ ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н. И. Пирогова (117997, РФ, г. Москва, ул. Островитянова, г. 1)

Адрес для переписки: 115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН, хирургическое отделение опухолей женской репродуктивной системы, Шаповалов Дмитрий Алексеевич; e-mail: shapovalov.dmitry@gmail.com

Тазовая и поясничная лимфодиссекция до сих пор не являются стандартом хирургического лечения рака тела матки даже у пациенток с высоким риском регионарного метастазирования. Цель работы состояла в разработке показаний к селективной тазовой лимфаденэктомии при раке тела матки. Были изучены и проанализированы результаты лечения 298 больных раком тела матки IA—IIIc стадий в возрасте 30—89 лет, которым проведено лечение в ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН за период с 1998 по 2004 г. У 18 (6,0%) больных выявлено поражение регионарных лимфатических узлов. Пятилетняя общая и безрецидивная выживаемость составила $77,8 \pm 2,5$ и $73,0 \pm 2,3\%$, 10-летняя — $69,9 \pm 2,9$ и $65,8 \pm 3,6\%$ соответственно. Выявлены факторы риска метастазирования в регионарные лимфатические узлы: смешанный рак, глубина инвазии более $\frac{1}{2}$ толщины миометрия, переход опухоли на строуму шейки матки, размер опухоли более 4 см и диссеминация по брюшине малого таза. В зависимости от наличия и сочетания данных факторов прогноза вероятность регионарного метастазирования в исследовании варьировала от 2,5 до 100%.

Ключевые слова: рак тела матки, тазовая лимфаденэктомия.

Рак тела матки (РТМ) занимает 7-е место (4%) в структуре заболеваемости женщин злокачественными новообразованиями в мире [1]. В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями женского населения России РТМ занимает 3-е место (7,1%) и 1-е место среди злокачественных опухолей женских гениталий. Заболеваемость РТМ в 2008 г. составила 15,1 на 100 000 женщин и продолжает увеличиваться. В 2008 г. в России зарегистрировано 18 789 больных с впервые в жизни установленным диагнозом РТМ, таким образом, с 2003 по 2008 г. прирост числа вновь выявленных больных РТМ составил 13,5% [2].

В 1988 г. FIGO рекомендовала определять стадию РТМ и оценивать состояние регионарных лимфатических узлов на основании данных хирургического вмешательства и послеоперационного гистологического исследования. Однако, предложив классификацию хирургических стадий РТМ, FIGO не определила необходимый diagnosti-

ческий алгоритм для определения стадии. Таким образом, тазовая и поясничная лимфодиссекция до настоящего времени не является стандартом хирургического лечения РТМ даже у пациенток с высоким риском регионарного метастазирования [3; 4]. Объем хирургического вмешательства в каждом случае выбирается индивидуально. На решение о выборе объема операции влияют не только наличие факторов, увеличивающих возможность регионарного метастазирования, но и анатомические особенности больных, обусловленные эндокринно-обменными нарушениями [4; 5].

Для оценки состояния тазовых и поясничных лимфатических узлов можно использовать интраоперационную пальпацию, выполнять биопсию увеличенных лимфатических узлов, одного произвольно выбранного лимфатического узла, селективную или тотальную лимфаденэктомию. Ряд авторов склоняются к необходимости полного удаления тазовых и поясничных лимфатических коллекторов [6—9], в то время как другие сомневаются в пользе такого вмешательства при РТМ ранних стадий, когда риск лимфогенных метастазов низок, например при высокодифференцированной опухо-

ли, прорастающей миометрий менее чем на две трети толщины [10]. Некоторые авторы считают лимфаденэктомиию нецелесообразной при высокодифференцированных опухолях независимо от стадии и при опухолях I стадии независимо от степени дифференцировки опухоли [11; 12]. Существует точка зрения, согласно которой необходимости в выполнении регионарной лимфаденэктомии при высоком риске лимфогенного метастазирования РТМ нет, т. к. в послеоперационном периоде все равно будет проведена лучевая терапия (ЛТ), например при II стадии заболевания [13]. Некоторые авторы считают достаточной биопсию тазовых лимфатических узлов или выполняют биопсию только увеличенных лимфатических узлов [14].

При определении тактики хирургического вмешательства у больных РТМ следует помнить, что метастатические измененные лимфатические узлы на момент операции оказываются увеличенными менее чем у 10%, а микрометастазы встречаются более чем в 90% случаев [15]. С учетом этого очевидно, что пальпация и биопсия увеличенных или отдельных произвольно выбранных лимфатических узлов при РТМ неинформативны с диагностической точки зрения.

Удаление макрометастазов в лимфатических узлах необходимо, поскольку при них малоэффективна ЛТ, а выживаемость больных с макрометастазами, которым выполнена лимфаденэктомия, сравнима с таковой у больных с микрометастазами. Неудаление метастатических измененных поясничных лимфатических узлов повышает риск смерти больных РТМ в 6,85 раза [16]. Наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах повышает риск прогрессирования РТМ в 6 раз [17].

Доказано, что нет статистически достоверных различий в выживаемости больных РТМ IB и IC стадий, а также больных с умеренно- и низкодифференцированным РТМ, которым выполнена тотальная регионарная лимфаденэктомия [18, 19]. Отмечено повышение выживаемости больных РТМ без метастазов в лимфатических узлах, которым выполнена лимфаденэктомия, что свидетельствует о неточности выявления микрометастазов на светооптическом уровне [20]. Аналогичная ситуация уже описывалась ранее при раке молочной железы и целом ряде других опухолей. Таким образом, цели лимфаденэктомии при РТМ можно определить следующим образом: уточнение стадии, повышение выживаемости больных с метастазами, определение тактики дальнейшего лечения (возможность отказа от послеоперационной ЛТ).

На сегодняшний день большинство авторов склоняются к тому, что селективная лимфаденэктомия достаточна для оценки состояния лимфатических узлов при РТМ [1; 21—24], однако единых показаний к выполнению данного хирургического вмешательства нет.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для определения показаний к селективной лимфаденэктомии при РТМ нами изучены и проанализированы результаты лечения 298 больных РТМ IA—IIIС стадий в возрасте 30—89 лет (средний возраст $60,9 \pm 0,6$ года, медиана 61 год), которым проведено лечение в ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН за период с 1998 по 2004 г. Пятидесяти шести из них выполнена экстирпация матки

с придатками (ЭМП) и селективная тазовая лимфаденэктомия (СТА). Комбинированное лечение получила 151 (50,7%) больная (149 больным проведено хирургическое лечение и ЛТ, 2 — хирургическое лечение и полихимиотерапия), комплексное (операция, ЛТ и химиотерапия) — 3 (1,0%). Гормонотерапию получили 6 (2,0%) больных.

Больные наблюдались от 1 до 129 мес (медиана 66 мес). Шестьдесят пять из 298 (21,8%) больных РТМ умерли в сроки от 3 до 102 мес от начала лечения, 49 из них — от прогрессирования основного заболевания. Медиана продолжительности жизни этих пациенток составила 26,2 мес, четверть больных умерли в сроки до 17,2 мес. У 28 из 298 (9,4%) больных известны сроки появления и локализация прогрессирования заболевания (табл. 1). На момент проведения исследования только 9 из 28 (32,1%) пациенток с прогрессированием заболевания были живы. Рецидив у большинства больных РТМ возникал в течение 1-го года наблюдения. Метастазы в регионарных лимфатических узлах чаще выявляли у больных РТМ в первые 2 года (медиана 10 мес). Отдаленные метастазы у больных РТМ также чаще выявляли в первые 2 года от начала лечения (медиана 12 мес). Таким образом, риск прогрессирования РТМ в виде рецидива был наибольшим в первый год наблюдения, регионарных и отдаленных метастазов — в первые 2 года.

МЕТОДЫ СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ

Рассчитывали средние значения числовых признаков, ошибку среднего, медиану. Выбор статистических критериев для сравнения средних значений в группах осуществляли после изучения распределения признака и сравнения его с распределением Гаусса по критерию Колмогорова—Смирнова. При распределении признака, отличающемся от нормального, применяли непараметрические методы сравнения несвязанных признаков (Крускала—Уоллиса, ANOVA при количестве групп более двух и Манна—Уитни при двух сравниваемых группах). При распределении признака, соответствующем нормальному, достоверность рассчитывали дисперсионным анализом, при количестве групп более двух — с учетом множественности сравнений по критерию Шеффе. Для сравнения частот строили таблицы сопряженности признаков. Достоверность определяли с помощью точного критерия Фишера (при небольших объемах групп) и непараметрического критерия χ^2 . Выживаемость рассчитывали по методу Каплана—Майера, при сравнении групп использовали метод log-rank. При множественных сравнениях для расчета достоверности использовали поправку Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ [25].

При выборе статистических процедур учитывали методологические требования Международного конгресса по гармонизации GCP «Статистические принципы для клинических исследований» [26]. Все вычисления проводили на персональном компьютере с применением математических пакетов «Statistica» и «SPSS».

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ отдаленных результатов лечения 298 больных РТМ показал, что 5-летняя общая выживаемость составила $77,8 \pm 2,5\%$, 10-летняя — $69,9 \pm 2,9\%$ (медиана

Таблица 1

Распределение больных РТМ в зависимости от характера прогрессирования

Вид прогрессирования	Число больных	Сроки появления и локализация
Рецидив	7	7—12 мес (медиана 10 мес)
Регионарные метастазы	7	5—21 мес (медиана 10 мес)
Рецидив и регионарные метастазы	3	11, 24, 31 мес (выявлены одновременно)
Рецидив и отдаленные метастазы	1	Рецидив (11 мес), метастазы в легких (12 мес)
Рецидив, регионарные и отдаленные метастазы	5	Рецидив, регионарные метастазы, метастазы в печени (12 мес) (n = 1). Рецидив, регионарные метастазы (21 мес), метастазы в легких (20 мес) (n = 1). Рецидив (3 мес), регионарные метастазы (8 мес), метастазы в легких, печени, лимфатических узлах средостения (8 мес) (n = 1). Рецидив, регионарные метастазы (6 мес), метастазы в костях (6 мес) (n = 1). Рецидив, регионарные метастазы, метастазы в надключичных лимфатических узлах (10 мес) (n = 1)
Отдаленные метастазы	5	Метастазы в легких (19 мес) (n = 1). Метастазы в печени (6—26 мес, медиана 12 мес) (n = 4)
Всего	28	3—31 мес (медиана 11 мес)

не достигнута). Пятилетняя безрецидивная выживаемость больных РТМ составила $73,0 \pm 2,3\%$, 10-летняя — $65,8 \pm 3,6\%$ (медиана не достигнута). Проведена оценка отдаленных результатов лечения больных РТМ в зависимости от методов лечения. Больные РТМ были разделены на 4 группы: больные, которым выполнена ЭМП (n = 126), ЭМП + СТЛ (n = 20), ЭМП + ЛТ (n = 116) и ЭМП + СТЛ + ЛТ (n = 36). Химиотерапия и гормонотерапия в данном исследовании проводились крайне редко, поэтому в анализе не учитывались. При сравнении общей и безрецидивной выживаемости в рассматриваемых группах не выявлено достоверных различий ($p > 0,05$) (рис. 1). Полученные результаты свидетельствуют о сопоставимой общей и безрецидивной выживаемости при адекватном выборе метода лечения в соответствии с учетом совокупности индивидуальных прогностических факторов. Пятилетняя общая и безрецидивная выживаемость больных, которым выполнена ЭМП, значительно выше, чем выживаемость больных, которым проведено комбинированное лечение (ЭМП + ЛТ и ЭМП + СТЛ + ЛТ). Это объясняется прежде всего более ранней стадией заболевания и отсутствием неблагоприятных прогностических факторов у больных, которым выполнена ЭМП.

Оценена общая выживаемость 298 больных РТМ в зависимости от прогностических факторов без учета влияния методов лечения. При многофакторном анализе отдаленных результатов лечения больных выявлены следующие независимые значимые факторы прогноза жизни больных РТМ: возраст ($p = 0,0001$), степень дифференцировки опухоли ($p = 0,0024$), глубина инвазии миометрия ($p = 0,003$), наличие метастазов в забрюшинных лимфатических узлах ($p = 0,004$), стадия заболевания ($p = 0,036$).

Для формирования групп риска прогрессирования заболевания изучена безрецидивная выживаемость больных РТМ независимо от методов лечения. При многофакторном анализе статистически значимо связанными с прогрессированием РТМ оказались пять признаков: возраст ($p = 0,0016$), стадия заболевания ($p = 0,006$), глубина инвазии миометрия ($p = 0,0089$), степень дифференцировки опухоли ($p = 0,028$), наличие метастазов в забрюшинных лимфатических узлах ($p = 0,024$).

Далее проанализированы факторы прогноза лимфогенного метастазирования РТМ. Эти данные имеют большое значение для определения показаний к выполнению СТЛ. Для решения данной задачи изучены результаты лечения больных, имеющих метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов.

Из 298 больных РТМ у 18 (6,0%) установлено поражение регионарных лимфатических узлов. Из них у 11 (61,1%) пациенток поражение выявлено после операции при гистологическом исследовании операционного материала, у остальных семи метастазы в регионарных лимфатических узлах были выявлены в сроки от 5 до 21 мес после проведенного лечения (медиана 10 мес), и это было единственным проявлением прогрессирования заболевания (у 4 из них были диагностированы метастазы в поясничных лимфатических узлах) (см. табл. 1).

Факторами, повышающими риск поражения регионарных лимфатических узлов, оказались смешанный рак, глубина инвазии более половины толщины миометрия, наличие опухолевых эмболов в лимфатических щелях, переход опухоли на строму шейки матки, размер опухоли более 4 см и диссеминация по брюшине малого таза (табл. 2). В то же время такие факторы, как возраст, степень дифференцировки опухоли и наличие метаста-

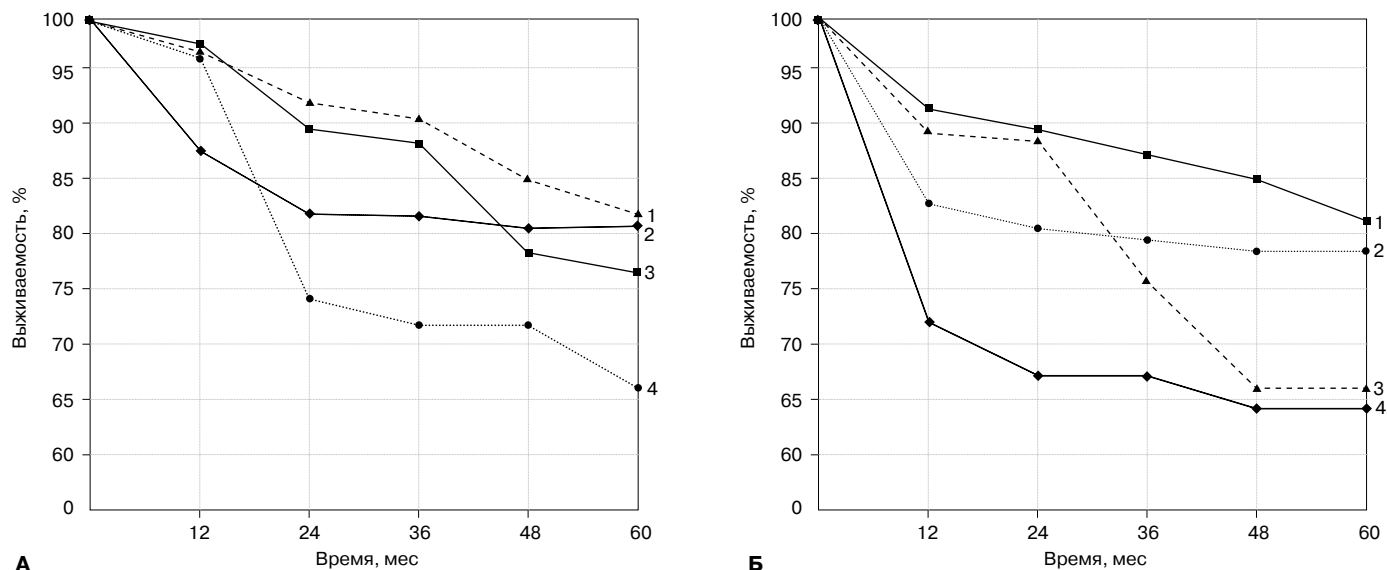


Рисунок 1. Выживаемость больных РТМ в зависимости от методов лечения. 1 — ЭМП; 2 — ЭМП + СТЛ; 3 — ЭМП + ЛТ; 4 — ЭМП + СТЛ + ЛТ.

А. Общая выживаемость. **Б.** Безрецидивная выживаемость.

зов в яичниках, не были значимо связаны с выявлением метастазов в регионарных лимфатических узлах. Мы отметили повышение частоты метастатического поражения регионарных лимфатических узлов при уменьшении степени дифференцировки опухоли, но не получили достоверных различий. Из-за малого числа наблюдений не было получено достоверных различий при анализе гистологических типов РТМ (кроме смешанного рака). Мы не рассматривали хирургическую стадию как самостоятельный фактор риска метастазирования в регионарные лимфатические узлы, поскольку, во-первых, оно учитывается при определении стадии, а во-вторых, мы анализировали все факторы, определяющие стадию (глубину инвазии, распространение на шейку матки и т. д.), по отдельности.

Оценена частота выявления сочетания пяти неблагоприятных клинических факторов, определяемых до или во время операции (смешанный вариант РТМ, размер опухоли более 4 см, глубина инвазии миометрия более половины его толщины, переход опухоли на строму шейки матки и диссеминация по брюшине малого таза).

В табл. 3 показана частота метастазирования в регионарные лимфатические узлы в зависимости от различных комбинаций перечисленных неблагоприятных факторов. Так, у одной больной выявлены все 5 неблагоприятных факторов и обнаружены метастазы в регионарных лимфатических узлах. Еще у одной больной выявлены 4 неблагоприятных фактора, но метастазы в регионарных лимфатических узлах не обнаружены. Таким образом, у больных с 4—5 неблагоприятными факторами частота метастатического поражения регионарных лимфатических узлов, по нашим данным, составила 50,0%. Девять больных имели по 3 неблагоприятных фактора, у 3 из них выявлены метастазы в регионарных лимфатических узлах (33,3%). У 28 больных отмечено сочетание 2 неблагоприятных факторов, у 5 из них вы-

явлены метастазы в регионарных лимфатических узлах (20,7%). У 98 больных наблюдался только один неблагоприятный фактор поражения регионарных лимфатических узлов, у 4 из них выявлены метастазы в регионарных лимфатических узлах (4,1%).

У 160 больных в исследовании факторов риска поражения регионарных лимфатических узлов не было. Метастазы выявлены у 4 из них (2,5%). Таким образом, чем меньше число неблагоприятных факторов выявлено у больной РТМ, тем меньше риск поражения регионарных лимфатических узлов (рис. 2).

Следует отметить, что частота метастазов в регионарных лимфатических узлах у больных РТМ с инвазией менее половины толщины миометрия в отсутствие перехода опухоли на строму шейки матки независимо от размеров опухоли составила лишь 2,5% (данная комбинация отмечена у 197 больных; 66,1%). При переходе опухоли на строму шейки матки и инвазии менее половины толщины миометрия независимо от размеров опухоли частота метастазов в регионарных лимфатических узлах увеличивалась до 12,5% (8 больных; 2,7%). У 60 больных в исследовании глубина инвазии была более половины толщины миометрия, в то время как размер опухоли был менее 4 см и опухоль не переходила на строму шейки матки. Частота метастатического поражения регионарных лимфатических узлов у этих больных составила 6,7% (метастазы выявлены у 4 из 60 больных). У 37 больных глубина инвазии была менее половины толщины миометрия, в то время как размер опухоли был более 4 см и не было перехода опухоли на строму шейки матки. Частота метастатического поражения регионарных лимфатических узлов у этих больных составила 2,7% (метастазы выявлены у 1 из 37 больных). У 4 больных глубина инвазии была менее половины толщины миометрия, размер опухоли был менее 4 см, но опухоль переходила на строму шейки матки. Метастатического поражения

Таблица 2

Факторы прогноза метастазов в регионарных лимфатических узлах при РТМ

Признак, статистическая достоверность	n	Частота метастазов	
		абс.	%
Возраст ($p_{1,2,3,4} > 0,05$)			
1. Моложе 50 лет	28	4	14,3
2. 50—59 лет	102	5	4,9
3. 60—69 лет	105	5	4,8
4. 70 лет и старше	63	4	6,4
Гистологический тип опухоли ($p_{1-2} = 0,18$; $p_{1-3} > 0,054$; $p_{1-4} = 0,0015$; $p_{2-3} > 0,05$; $p_{2-4} = 0,03$; $p_{3-4} = 0,23$)			
1. Аденокарцинома эндометриоидная	210	9	4,3
2. Аденокарцинома с плоскоклеточной метаплазией	71	6	8,5
3. Светлоклеточный рак	9	1	11,1
4. Смешанный рак	5	2	40
5. Серозный рак ^a	3	0	0
Степень дифференцировки опухоли ($p_{1,2,3,4} > 0,05$)			
1. Высокая	65	3	4,6
2. Умеренная	123	7	5,7
3. Разная	76	5	6,6
4. Низкая	34	3	8,8
Глубина инвазии миометрия ($p_{1-2} = 0,0026$; $p_{1-3} > 0,05$; $p_{2-3} > 0,05$)			
1. Менее половины толщины миометрия	205	6	2,9
2. Более половины толщины миометрия	74	9	12,2
3. До серозной оболочки	17	1	5,9
4. Прорастание серозной оболочки ^a	2	2	100,0
Наличие опухолевых эмболов в лимфатических щелях ($p_{1-2} = 0,00001$)			
1. Нет	270	9	3,3
2. Есть	28	9	32,1
Распространение опухоли на шейку матки ($p_{1-2} > 0,05$; $p_{1-3} = 0,006$; $p_{2-3} = 0,069$)			
1. Нет	248	12	4,8
2. Распространение на слизистую	26	1	3,9
3. Распространение на строму	24	5	20,8
Диссеминация по брюшине малого таза ($p_{1-2} = 0,0048$)			
1. Нет	290	16	5,5
2. Есть	6	2	33,3
Наибольший размер опухоли ($p_{1-2} > 0,05$; $p_{1-3} = 0,02$; $p_{2-3} = 0,0088$)			
1. Не более 2 см	52	1	1,9
2. 2—4 см	101	3	3,0
3. Более 4 см	64	9	14,1
Метастазы в яичниках ($p_{1-2} = 0,6$)			
1. Нет	293	18	6,1
2. Есть	5	0	0

^a Сравнения не проводили из-за малого числа больных.

регионарных лимфатических узлов не выявлено ни у одной больной.

Таким образом, при анализе описанных факторов риска можно оценить риск поражения регионарных лимфатических узлов у больных РТМ и определить целесообразность выполнения лимфаденэктомии. При формировании показаний к СТЛ были отобраны только те факторы, которые достоверно влияют на частоту метастазов в регионарных лимфатических узлах и которые можно оценить до- и интраоперационно. В связи с этим при формировании показаний к СТЛ мы не учитывали такой фактор, как наличие опухолевых эмболов в лимфатических щелях. Этот фактор достоверно и значимо повышает риск метастазирования в регионарные лимфатические узлы (табл. 2), однако выявить его до или во время операции не представляется возможным.

Мы отметили повышение частоты метастатического поражения регионарных лимфатических узлов при уменьшении степени дифференцировки опухоли, но не получили достоверных различий. Кроме того, из-за малого числа наблюдений не было получено достоверных различий при анализе редких прогностически неблагоприятных гистологических типов опухоли (кроме смешанного рака) с частотой регионарных метастазов. Эти факторы также не учитывались при формировании показаний к СТЛ в нашем исследовании.

ОБСУЖДЕНИЕ

Метастатически измененные лимфатические узлы на момент операции оказываются увеличенными менее чем у 10% больных РТМ, определенная, хотя и низкая, вероятность их поражения существует даже в отсутствие факторов, повышающих риск регионарного метастазирования [15]. Таким образом, ни пальпация, ни биопсия произвольно выбранных лимфатических узлов при РТМ неинформативны с диагностической точки зрения. Очевидно и то, что с увеличением числа удаленных

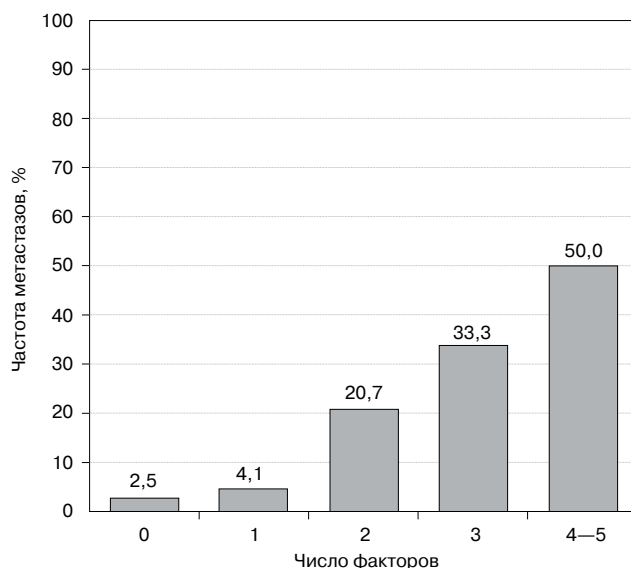
**Рисунок 2. Частота метастазов РТМ в регионарных лимфатических узлах в зависимости от числа факторов риска.**

Таблица 3

Комбинации прогностических факторов и частота поражения регионарных лимфатических узлов

Смешанный рак	Инвазия более половины толщины миометрия	Размер опухоли более 4 см	Переход на строму шейки матки	Диссеминация по брюшине малого таза	Число больных с метастазами в лимфатических узлах	Число больных без метастазов в лимфатических узлах	Число больных с данной комбинацией факторов	Частота метастазов при данной комбинации, %	Число факторов прогноза (частота метастазов)
+	+	+	+	+	1	0	1	100,0	4–5 (50,0%)
+	+	+	+		–	–	–	–	
+	+	+		+	–	–	–	–	
+		+	+	+	–	–	–	–	
	+	+	+	+	0	1	1	0	
+	+		+	+	–	–	–	–	
+	+	+			1	0	1	100,0	3 (33,3%)
+		+	+		–	–	–	–	
	+	+	+		2	2	4	50,0	
+	+		+		0	1	1	0	
+	+			+	0	1	1	0	
+		+		+	–	–	–	–	
	+	+	+	+	–	–	–	–	
+			+	+	–	–	–	–	
	+		+	+	0	2	2	0	
+	+				0	1	1	0	2 (20,7%)
+		+			–	–	–	–	
		+	+		1	3	4	25,0	
	+	+			3	13	16	18,8	
+			+		–	–	–	–	
	+		+		1	6	7	14,3	
+				+	–	–	–	–	
	+		+	+	1	0	1	100,0	
		+		+	–	–	–	–	
			+	+	–	–	–	–	1 (4,1%)
+					–	–	–	–	
	+				3	54	57	5,3	
		+			1	36	37	2,7	
			+		0	4	4	0	0 (2,5%)
				+	–	–	–	–	
					4	156	160	2,5	
Всего					18	280	298	–	6,0%

лимфатических узлов возрастает точность определения хирургической стадии, а также, возможно, лечебный эффект лимфаденэктомии. С другой стороны, при тотальном удалении тазовых и поясничных лимфатических коллекторов у больных РТМ частота осложнений достигает 20%, причем треть из них расценивают как тяжелые [27]. В связи с этим СТА представляется наиболее приемлемым диагностическим вмешательством для тех больных РТМ, у которых нет признаков метастатического поражения регионарных лимфатических узлов, но имеются факторы риска лимфогенных метастазов.

Для формирования показаний к СТА при РТМ нами были отобраны следующие факторы: смешанный рак, глубина инвазии более половины толщины миометрия, переход опухоли на строуму шейки матки, размер опухоли более 4 см и диссеминация по брюшине малого таза, что не противоречит данным мировой литературы, согласно которым чем больше глубина инвазии миометрия и размер опухоли, тем больше вероятность поражения регионарных лимфатических узлов [28—31]. Переход опухоли на строуму шейки матки и диссеминация по брюшине также являются факторами неблагоприятного прогноза, повышающими вероятность регионарного метастазирования РТМ [21; 32; 33].

По нашему мнению, СТА при РТМ показана в следующих случаях:

1) при прорастании серозной оболочки матки (риск регионарных метастазов 100,0%);

2) при выявлении по данным предоперационного гистологического исследования смешанного РТМ (риск 40,0%);

3) при диссеминации опухоли по брюшине малого таза (риск 33,3%);

4) при сочетании 2 из 3 факторов и более: инвазия более половины толщины миометрия, переход опухоли на строуму шейки матки, размер опухоли более 4 см (риск 14,3—50,0%).

Следует отметить, что в нашем исследовании первые три показания не встречались самостоятельно.

В остальных случаях мы считаем возможным выполнить ЭМП.

При морфологически подтвержденном поражении тазовых или поясничных лимфатических узлов больным РТМ показана ЭМП с тотальной тазовой и поясничной лимфаденэктомией для реализации не только диагностических, но и лечебных задач данного вмешательства.

Согласно нашим данным, СТА статистически достоверно не влияет ни на общую, ни на безрецидивную выживаемость больных РТМ независимо от проводимых методов лечения (рис. 1), что согласуется с данными последних рандомизированных исследований [34; 35]. Возможно, причина кроется в том, что как в этих исследованиях, так и в нашей работе больным РТМ не удаляли поясничные лимфатические узлы. Возможно (и мы склоняемся к этой точке зрения), для того чтобы понять данный факт, следует обратиться к результатам классических исследований лимфаденэктомии при РТМ. Согласно им частота поражения лимфатических узлов при РТМ I клинической стадии, которая диагностируется у 65—70% больных, даже при выполнении тотальной тазовой и поясничной лимфаденэктомии не превышает

11% (частота метастазов в тазовых лимфатических узлах 9%, в поясничных 5%) [15], поэтому вряд ли удастся доказать улучшение выживаемости всей популяции больных РТМ при выполнении лимфаденэктомии.

Очевидно, что лимфаденэктомия оказывает лечебный эффект в группе больных с метастазами [16]. Несомненно и диагностическое значение этого вмешательства, которое уже обсуждалось выше. Нельзя забывать об ошибках и о неточностях, которые могут быть допущены на этапе предоперационного обследования, и о том, что 90% метастазов в лимфатических узлах при РТМ являются микроскопическими [15] и их можно выявить только при тщательном гистологическом исследовании. Таким образом, мы считаем целесообразным выполнять СТА не только при наличии перечисленных выше показаний, но и в сомнительных случаях, чтобы наилучшим образом решить диагностические и лечебные задачи хирургического вмешательства при РТМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Опухоли женской репродуктивной системы / М. И. Давыдов, В. П. Летягин, В. В. Кузнецов (ред.). — М.: МИА, 2007. — С. 228—254.
2. Давыдов М. И., Аксель Е. М. Заболеваниями населения России и стран СНГ // Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. — 2010. — Т. 21, № 2 (прил. 1). — 158 с.
3. Бохман Я. В. Руководство по онкогинекологии. — Л.: Медицина, 1989. — С. 275—340.
4. Podratz K. S., Mariani A., Webb M. J. Staging and therapeutic value of lymphadenectomy in endometrial cancer // Gynecol. Oncol. — 1998. — Vol. 70. — P. 163—164.
5. The role of the endocrine factors and obesity in hormone-dependent gynecological neoplasms / Maggino T., Pirrone T., Velluti F., Bucciante G. // Eur. J. Gynecol. Oncol. — 1993. — Vol. 14, N 2. — P. 119—126.
6. Barends M. N., Kilgore L. C. Complete surgical staging of early endometrial carcinoma: optimizing patient outcome // Semin. Radiat. Oncol. — 2000. — Vol. 10. — P. 3—7.
7. Homesley H. B., Zaino R. Endometrial cancer: prognostic factors // Semin. Oncol. — 1994. — Vol. 21. — P. 71—78.
8. Mikuta J. J. Preoperative evaluation and staging of endometrial cancer // Cancer. — 1995. — Vol. 76. — P. 2041—2043.
9. Indispensability of pelvic and paraaortic lymphadenectomy in endometrial cancers / Yokoyama Y., Maruyama H., Sato S., Saito Y. // Gynecol. Oncol. — 1997. — Vol. 64. — P. 411—417.
10. Creasman W. L. Limited disease: role of surgery // Semin. Oncol. — 1994. — Vol. 21. — P. 79—83.
11. Using FIGO histologic grade to determine when to perform lymphadenectomy in endometrioid adenocarcinoma of the endometrium / Geisler J. P., Wicmann M. C., Zhou Z., Miller G. A., Geisler H. E. // Eur. J. Gynecol. Oncol. — 1996. — Vol. 17. — P. 204—207.
12. Clinical stage I adenocarcinoma of the endometrium: analysis of recurrences and the potential benefit of staging lymphadenectomy / Belinson J. L., Lee K. R., Badger G. J., Pretorius R. G., Jarrel M. A. // Gynecol. Oncol. — 1992. — Vol. 44. — P. 17—23.
13. Stage I and II endometrial cancer, should lymphadenectomy still be done? / Descamps P., Body G., Calais G., Moire C., Fignon A., Jourdain O., Le Floch O., Lansac J. // J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. — 2005. — Vol. 24. — P. 794—801.
14. Should selective paraaortic lymphadenectomy be part of surgical staging for endometrial cancer / Faught W., Krepart G. V., Lotocki R., Heywood M. // Gynecol. Oncol. — 1994. — Vol. 55. — P. 51—55.
15. Surgical Pathologic Spread Patterns of Endometrial Cancer. A Gynecologic Oncology Group Study / Creasman W. T., Morrow C. P., Bundy B. N., Homesley H. D., Graham J. E., Heller P. B. // Cancer. — 1987. — Vol. 60. — P. 2035—2041.
16. Resection of lymph node metastases influences survival in stage IIIc endometrial cancer / Havrilesky L. J., Cragun J. M., Calingaert B., Synan I., Secord A. A., Soper J. T., Clarke-Pearson D. L., Berchuck A. // Gynecol. Oncol. — 2005. — Vol. 99, N 3. — P. 689—695.

17. Lurain J.R. Uterine Cancer//Novak's Gynecology (12th ed.). — Williams & Wilkins, 1996. — P. 1057—1092.
18. Long-term outcomes of therapeutic pelvic lymphadenectomy for stage I endometrial adenocarcinoma / Mohan D. S., Samuels M. A., Selim M. A., Shalodi A. D., Ellis R. J., Samuels J. R., Yun H. J. // *Gynecol. Oncol.* — 1998. — Vol. 70, N 2. — P. 165—171.
19. Orr J. W., Jr., Holimon J. L., Orr P. F. Stage I corpus cancer: is teletherapy necessary? // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 1997. — Vol. 176, N 4. — P. 777—788.
20. Van Trappen P. O., Pepper M. S. Lymphangiogenesis and lymph node microdissemination // *Gynecol. Oncol.* — 2001. — Vol. 82, N 1. — P. 1—3.
21. Лекции по онкогинекологии / М. И. Давыдов, В. В. Кузнецов (ред.). — М: МЕДпресс-информ, 2009. — С. 243—253.
22. Burke T. W., Eifel P. J., Muggia F. M. Cancer of the uterine body // V. DeVita, S. Hellman, S. Rosenberg (eds.). *Cancer: Principles and Practice of Oncology.* — 6th ed. — Lippincott, Williams and Wilkins, 2001. — P. 1573—1594.
23. Analysis of survival after laparoscopic-assisted vaginal hysterectomy compared with the conventional abdominal approach for early-stage endometrial carcinoma: a review of the literature / Gil-Moreno A., Díaz-Feijoo B., Morchón S., Xercavins J. // *J. Minim. Invasive Gynecol.* — 2006. — Vol. 13, N 1. — P. 26—35.
24. An analysis of approaches to the management of endometrial cancer in North America: a CTF study / Maggino T., Romagnolo C., Landoni F., Sartori E., Zola P., Gadducci A. // *Gynecol. Oncol.* — 1998. — Vol. 68. — P. 274—270.
25. Вуколов Э. А. Основы статистического анализа. — М.: «Форум», 2008. — С. 52—170.
26. ICH Guidelines // *Good Clin. Pract. J.* — 1998. — Vol. 5, N 4. — P. 27—37.
27. Налбандян А. В. Расширенные операции при раке тела матки I—III клинических стадий: Дис... канд. мед. наук. — М., 2006. — С. 94.
28. Максимов С. Я. Минимальный рак эндометрия. — СПб., 2004. — С. 28.
29. Postoperative external irradiation and prognostic parameters in stage I endometrial carcinoma / Aalders J., Abeler V., Kolstad P., Onsrud M. // *Obstet. Gynecol.* — 1980. — Vol. 56. — P. 419—446.
30. Boronow R. C., Morrow C. P., Creasman W. T. Surgical staging in endometrial cancer: clinical-pathologic findings of a prospective study // *Obstet. Gynecol.* — 1984. — Vol. 63, N 6. — P. 825—832.
31. Bucy G. S., Mendenhall W. M., Morgan L. S. Clinical stage I and II endometrial carcinoma treated with surgery and/or radiation therapy: analysis of prognostic and treatment related factors // *Gynecol. Oncol.* — 1989. — Vol. 33, N 3. — P. 290—295.
32. Баринов В. В. Злокачественные опухоли тела матки // М. И. Давыдов (ред.). *Энциклопедия клинической онкологии.* — М., 2004. — С. 420.
33. The utility of the revised International Federation of Gynecology and Obstetrics histological grading of endometrial adenocarcinoma using a defined nuclear grading system / Zaino R. J., Kurman R. J., Diana K. L., Morrow C. P. // *Cancer.* — 1995. — Vol. 75. — P. 81—86.
34. Efficacy of systematic pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer (MRC ASTEC trial): a randomised study / ASTEC study group, Kitchener H., Swart A. M., Qian Q., Amos C., Parmar M. K. // *Lancet.* — 2009. — Vol. 373. — P. 125—136.
35. Systematic pelvic lymphadenectomy vs. no lymphadenectomy in early-stage endometrial carcinoma: randomized clinical trial / Benedetti Panici P., Basile S., Maneschi F., Alberto Lissoni A., Signorelli M., Scambia G., Angioli R., Tateo S., Mangili G., Katsaros D., Garozzo G., Campagnutta E., Donadello N., Greggi S., Melpignano M., Raspagliesi F., Ragni N., Cormio G., Grassi R., Franchi M., Giannarelli D., Fosfati R., Torri V., Amoroso M., Crocè C., Mangioni C. // *J. Natl. Cancer Inst.* — 2008. — Vol. 100, N 23. — P. 1707—1716.

Поступила 20.01.2012

*Dmitry Alexeyevich Shapovalov¹, Valentina Mikhailovna Nechushkina²,
Igor Gennadievich Komarov³, Artem Viacheslavovich Nalbandyan⁴*

SELECTIVE PELVIC LYMPHADENECTOMY IN ENDOMETRIAL CANCER

¹ MD, Researcher, Department of Female Reproductive Malignancies, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

² MD, PhD, Senior Researcher, Gynecological Department, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

³ MD, PhD, DSc, Professor, Leading Researcher, Department of Surgical Diagnostics, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁴ MD, PhD, Associate Professor, Chair of Oncology, N. I. Pirogov RSMU (1, Ostrovityanova ul., Moscow, RF, 117997)

Address for correspondence: Shapovalov Dmitriy Alexeyevich, Department of Female Reproductive Malignancies, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, 24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478; e-mail: shapovalov.dmitry@gmail.com

Until now pelvic and paraaortic lymph node dissection is not a standard surgical treatment for endometrial cancer even in patients at high risk of regional metastases. The purpose of this study was to develop indications for selective pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer patients. We analyzed results of the treatment of 298 patients with stage IA—IIIC endometrial cancer aged 30 to 89 years treated at the N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS in 1998 – 2004. Eighteen patients (6.0%) had regional lymph node metastases. The 5-year overall and disease-free survival was 77.8 ± 2.5 and 73.0 ± 2.3 %. The respective 10-year rates were 69.9 ± 2.9 and 65.8 ± 3.6 %. Risk factors for regional lymph node metastases included mixed carcinoma, deep myometrial invasion, invasion of cervical stroma, tumor size more than 4 cm and pelvic peritoneum involvement. The risk of regional metastases was 2.5 to 100% depending on the presence and combination of these risk factors.

Key words: endometrial cancer, pelvic lymphadenectomy.

Лариса Сергеевна Яковлева¹, Наталья Борисовна Сенюта²,
Вера Николаевна Степина³, Елена Васильевна Гончарова⁴,
Лиана Ногаровна Щербак⁵, Самир Махаббат-оглы Джаббаров⁶,
Владимир Эдуардович Гурцевич⁷

ВИРУС ЭПШТЕЙНА—БАРР У БОЛЬНЫХ РАКОМ НОСОГЛОТКИ: ВАРИАНТЫ ГЕНА *LMP1*, ГУМОРАЛЬНЫЙ ОТВЕТ И КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ БОЛЕЗНИ

¹ Д. м. н., старший научный сотрудник, лаборатория вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

² К. м. н., ведущий научный сотрудник, лаборатория вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

³ Д. м. н., старший научный сотрудник, лаборатория вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁴ К. м. н., научный сотрудник, лаборатория вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁵ К. б. н., научный сотрудник, лаборатория вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁶ Аспирант, отделение опухолей дыхательно-пищеварительных путей, НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁷ Д. м. н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий, лаборатория вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

Адрес для переписки: 115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, лаборатория вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза, ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН, Гурцевич Владимир Эдуардович;
e-mail: vladgurtsevitch@yahoo.com

Целью работы стало изучение полиморфизма (дивергентности) онкогена *LMP1* вируса Эпштейна—Барр у больных раком носоглотки и лиц контрольных групп (пациенты с другими опухолями полости рта, больные инфекционным мононуклеозом и доноры крови). В частности, представлялось важным выяснить, влияют ли варианты онкогена *LMP1*, обладающие различной степенью полиморфизма (дивергентности), на клинические проявления болезни и гуморальный ответ к антигенам вируса Эпштейна—Барр. Объектом исследования служили опухолевая ткань, кровь или смывы из полости рта больных раком носоглотки и пациентов с другими опухолями полости рта, а также образцы крови больных инфекционным мононуклеозом и доноров крови. Полученные с помощью полимеразной цепной реакции образцы С-концевой области гена *LMP1* (25 — от больных раком носоглотки, 14 — от пациентов с другими опухолями полости рта, 10 — от больных инфекционным мононуклеозом и 15 — от доноров крови), были подвергнуты сиквенсному анализу. Плазма крови всех изучаемых лиц была протестирована на наличие антител классов IgG и IgA к капсидному и раннему антигенам вируса. Исследования показали, что у больных раком носоглотки и пациентов с другими опухолями полости рта (патологиями, ассоциированными и не ассоциированными с вирусом Эпштейна—Барр соответственно) одинаково часто встречались высоко дивергентные варианты онкогена *LMP1*. У больных инфекционным мононуклеозом и доноров крови высоко дивергентные варианты (за исключением у одного донора крови) отсутствовали. У больных раком носоглотки и пациентов с другими опухолями полости рта наличие вариантов *LMP1* с Сао-делецией, характеризующихся наиболее высокой туморогенной активностью по сравнению с другими вариантами *LMP1*, не коррелировало ни с более тяжелым проявлением болезни, ни с повышенными титрами вирус-специфических антител. Эти данные указывают на то, что высоко туморогенные варианты *LMP1* не влияют на течение опухолевого процесса. Впервые обнаружена повышенная заболеваемость раком носоглотки у представителей коренного населения Кавказа по сравнению с таковой у жителей центральной части России.

Ключевые слова: Вирус Эпштейна—Барр, рак носоглотки, латентный мембранный белок 1 (*LMP1*), секвенирование гена, полиморфизм *LMP1*.

Как известно, вирусом Эпштейна—Барр (ВЭБ), или лимфотропным вирусом герпеса человека 4-го типа, инфицировано более 90% населения земного шара. Являясь убиквитарным, этот вирус в то же время признан этиологическим фактором широкого спектра доброкачественных и злокачественных заболеваний. К их числу относят инфекционный мононуклеоз (ИМ), лимфому Беркитта (ЛБ), рак носоглотки (РНГ), лимфому Ходжкина (ЛХ), неходжкинские лимфомы (НХЛ) и ряд других [1]. Онкогенные потенции ВЭБ связаны с его способностью трансформировать клетки, что обусловлено функционированием 9 генов латентной инфекции вируса, кодирующих соответствующие белки [2]. Один из таких белков — латентный мембранный белок 1-го типа (LMP1), кодируемый одноименным геном (*LMP1*), играет чрезвычайно важную роль в патогенезе ассоциированных ВЭБ заболеваний, поскольку обладает свойствами онкобелка. LMP1 способен трансформировать В-лимфоциты и фибробласты грызунов (*Rat-1*) *in vitro* [3; 2], а его введение бестимусным мышам приводит к возникновению у них опухолей [4; 5]. Присутствие LMP1 необходимо и достаточно для осуществления трансформации В-клеток человека [6]. Он активирует многие сигнальные пути, включая фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K)-Akt, NF-κB и др. [7; 8]. Показано, что отдельные мутации гена *LMP1* влияют на его биологические свойства, что, вероятно, играет важную роль в этиопатогенезе вызываемых им заболеваний. Наиболее критичны мутации С-терминального цитоплазматического домена, которые влияют на иммуногенность и время полужизни LMP1 и усиливают его трансформирующий потенциал.

Молекулярный анализ образцов гена *LMP1*, выделенных в различных географических регионах, позволил выявить его полиморфизм, часто отражающий неодинаковую биологическую активность гена. Например, вариант гена *LMP1*, «Сао», содержащий делецию 30 пар нуклеотидов (п. н.) в С-концевой области и кодирующий соответствующий делецированный вариант белка LMP1Сао, обладает существенно более выраженным трансформирующим потенциалом *in vitro* [9]. Он оказался и более туморогенным для мышей с выраженным комбинированным иммунодефицитом (SCID) [10].

На основе сиквенсного анализа *upstream* и *downstream* участков С-концевой области гена *LMP1* D. M. Walling и соавт. выделили 22 сиквенсных варианта/генотипа гена, которые затем были разделены на 4 группы: LMP1B95.8/A, LMP1B95.8/B, LMP1B95.8/C и LMP1B95.8/D [11]. R. H. Edwards и соавт. из лаборатории N. Raab-Traub описали 6 вариантов гена, обозначение которых: China 1, China 2, Mediterranean + (Med +), Mediterranean — (Med —), North Carolina (NC) и Alaskan — отражает их географическое происхождение [12]. Каждый из этих вариантов характеризуется свойственным ему сочетанием аминокислотных (а. к.) замен, делеций, вставок и т. д., т. е. определенным полиморфизмом, по сравнению с LMP1B95.8, который используется в качестве стандартного (прототипного) варианта.

При этом варианты с незначительным полиморфизмом (3—4 а. к. замены) по отношению к LMP1B95.8 (например, LMP1B95.8/A) относят к низко дивергентным, а высоко полиморфные, т. е. варианты с большим числом а. к. замен, делеций, вставок — к высоко дивергентным. К числу последних следует причислить указанные выше 6 вариантов гена *LMP1* по классификации R. H. Edwards и соавт. [12]. Важно отметить, что выявляемые структурные изменения в гене *LMP1* часто располагаются в местах, влияющих на его транскрипцию, трансляцию или даже функцию.

Молекулярный механизм ассоциированного с ВЭБ канцерогенеза стал также предметом углубленного изучения. Было показано, что *LMP1*, являясь основным онкогеном ВЭБ, вносит весомый вклад в высокий метастатический потенциал РНГ [13; 14]. В частности, было показано, что *LMP1* в опухолевых клетках РНГ стимулирует экспрессию Snail и эпителиально-мезенхимальный переход в метастатических вариантах рака. Более того, обнаружено, что экспрессия Snail позитивно коррелирует с процессом метастазирования, но демонстрирует независимую обратную корреляцию с экспрессией E-кадгерина [15]. Полученные в последние годы данные позволили предположить у больных РНГ существование раковых эмбриональных клеток (CSC) и предшественников раковых клеток (CPC), хотя четкие параметры обоих типов клеток пока отсутствуют. Поиски S. Kondo и соавт. [16] внесли некоторую ясность в этот вопрос. В своих экспериментах они показали, что ген *LMP1* в эпителиальных клетках может индуцировать скорее CPC-, чем CSC-подобный фенотип, и предположили, что индуцированные *LMP1* фенотипические изменения вносят вклад в развитие РНГ.

С учетом тесной связи ряда новообразований человека с ВЭБ, предполагающей этиологическую роль вируса в их развитии, было проведено немало исследований, изучающих возможность использования вирусных маркеров в качестве диагностических и прогностических при этих заболеваниях. Иммунологические исследования РНГ в эндемичных для этого заболевания регионах показали, что высокие титры антител к антигенам ВЭБ часто могли быть обнаружены задолго до обнаружения опухоли, т. е. имеют высокую диагностическую ценность. Они также отражают клинические проявления болезни, такие, как ремиссия и рецидив, и, таким образом, могут быть использованы в качестве дополнительного метода наблюдения за больными [17—19]. Данные об ассоциации РНГ с ВЭБ в неэндемичных регионах, представленные лишь в единичных публикациях [20; 21], также подтверждают высокую значимость вирусных маркеров для диагностики и оценки клинического статуса больных РНГ [22].

Данная работа продолжает изучение особенностей ассоциированного с ВЭБ канцерогенеза у больных РНГ в неэндемичном регионе России и направлена на поиски корреляции между степенью дивергентности LMP-1 у этих больных, с одной стороны, гуморальным ответом к ВЭБ и клиническими проявлениями болезни, с другой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили образцы опухолевой ткани, крови или смывов из ротоглотки больных (РНГ)

и пациентов с другими опухолями полости рта (ДОПР), а также лимфоциты периферической крови больных ИМ и доноров крови (ДК). Больные РНГ и пациенты с ДОПР вошли в исследование в результате случайной выборки. Средний возраст больных в обеих группах составил 50,1 и 54,1 года соответственно. В группе больных РНГ и пациентов с ДОПР большинство составляли мужчины — 62,5 и 85,7% соответственно. Больные обеих групп по этнической принадлежности были подразделены на жителей Кавказа и жителей Центральной России. Из собранного биологического материала экстрагировали ДНК, которую использовали для амплификации (с помощью прямой полимеразной цепной реакции) С-концевой области гена *LMP1* ВЭБ. На следующем этапе полученные образцы гена больных и здоровых лиц были подвергнуты сиквенсному анализу: 24 образца — от больных РНГ, а в качестве контроля 14 образцов — от пациентов с ДОПР, 10 — от больных ИМ и 15 — от ДК. Секвенирование *LMP1* проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant. Обработку данных секвенирования проводили с помощью программ Chromas (DNA for Windows) и Vector NTI. Классификацию полученных образцов *LMP1* осуществляли согласно критериям, предложенным R. H. Edwards и соавт. [12], K. Sandvej и соавт. и D. M. Walling и соавт. [11]. Кроме того, в каждом образце плазмы крови больных и здоровых лиц определяли антитела классов IgG и IgA к капсидному (ВКА) и раннему (РА) антигенам ВЭБ. Титры вирус-специфических антител определяли с помощью реакции непрямой иммунофлюоресценции (ИФ), условия постановки которой и учет получаемых результатов подробно описаны ранее [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты сравнения последовательностей С-концевой области вариантов *LMP1* у больных РНГ, ИМ, пациентов с ДОПР и ДК представлены в табл. 1. Видно, что образцы *LMP1*, соответствующие прототипному варианту *LMP1*B95.8 либо низко дивергентному варианту *LMP1*B95.8A (оба с невысоким трансформирующим потенциалом), значительно чаще встречаются в группах ДК (у 12 из 15; 80%) и у больных ИМ (у 5 из 10; 50%) — при доброкачественных заболеваниях, завершающихся, как

правило, самовыздоровлением. У больных РНГ и пациентов с ДОПР низко дивергентные варианты обнаружены в 16,7% (у 4 из 24) и 14,2% (у 2 из 14) случаев соответственно. Для них более характерными оказались высоко дивергентные варианты *LMP1*, т. е. China1, Med+, Med– и NC. Эти варианты в совокупности составили для больных РНГ 83,3% (у 20 из 24) и для пациентов с ДОПР — 85,7% (у 12 из 14). Наличие высоко дивергентных вариантов *LMP1* у больных РНГ и пациентов с ДОПР по сравнению с вариантами *LMP1* у больных с доброкачественным лимфо-пролиферативным заболеванием (ИМ) и ДК нами отмечено впервые.

Среди высоко дивергентных вариантов *LMP1* особый интерес представляют варианты с так называемой Сао-делецией (10 а. к.), т. е. варианты China1 и Med+, характеризующиеся особенно высокой туморогенной активностью. У 10 больных ИМ ни один из этих вариантов обнаружен не был, и лишь один (China1) из 15 (6,7%) выявлен у ДК. У больных РНГ и пациентов с ДОПР Сао-варианты выявлены в 54,2% (у 13 из 24) и 50% (у 7 из 14) случаев соответственно. Эти данные еще раз подтвердили, что у онкологических больных, т. е. больных РНГ и пациентов с ДОПР, доминируют варианты *LMP1* с высокой туморогенной активностью, которые практически отсутствуют у больных с доброкачественными новообразованиями (ИМ) и у здоровых лиц (ДК).

Примерно одинаковая частота обнаружения высоко дивергентных вариантов *LMP1* у больных РНГ, этиологическая роль ВЭБ для которого доказана, и пациентов с ДОПР, этиологически не связанных с ВЭБ, позволяет задать целый ряд вопросов, на которые пока нет ответов. Можно, однако, предположить, что в активно размножающихся клетках любой злокачественной опухоли геном вируса подвергается существенным изменениям: происходят накопление мутаций и формирование высоко туморогенных генотипов *LMP1*. При этом одни и те же варианты вируса в одних случаях (генетическая предрасположенность, действие канцерогенов и иных факторов) становятся этиологическими факторами РНГ, а в других (у пациентов с ДОПР) в отсутствие предрасполагающих факторов остаются вирусами-«пассажирами».

Чтобы выяснить, существует ли корреляция между типом мутаций в *LMP1* и клиническими проявлениями болезни, а также гуморальным ответом к антигенам ВЭБ,

Таблица 1
Генотипы *LMP1* ВЭБ у больных РНГ и лиц контрольных групп

Группы больных и здоровых лиц	Число изученных образцов <i>LMP1</i>	Варианты <i>LMP1</i> , абс. число (%)					
		B95.8+B95.8/A	China1	China2	Med+	Med–	NC
РНГ	24	4 (16,7)	3 (12,5)	–	10 (41,7)	5 (20,8)	2 (8,3)
ДОПР	14	2 (14,2)	6 (42,9)	–	1 (7,3)	2 (14,2)	3 (21,4)
ИМ	10	5 (5)	–	–	–	2 (2)	1 (1)
ДК	15	12 (80)	1 (6,7)	–	–	–	2 (13,3)

Таблица 2

Варианты LMP1, этническая принадлежность и титры антител к ВЭБ у больных РНГ^а

№ п/п	Код больного	Пол	Возраст, годы	Этническая принадлежность ^б	Варианты LMP1	Титры антител к ВЭБ ^в			
						IgG		IgA	
						ВКА	РА	ВКА	РА
Больные РНГ, имеющие Сао-делецию в образцах LMP1									
1	Lg 116.1	Ж	40	Житель Центра России	China1	640	320	80	–
2	Lg 117.1	М	46	Житель Кавказа	Med+	640	160	80	–
3	5.3	М	54	Житель Центра России	Med+	640	80	160	–
4	7.1	М	68	Житель Кавказа	Med+	1280	320	160	80
5	8.1	М	34	Житель Кавказа	China1	640	160	20	20
6	16.1	М	52	Житель Кавказа	China1	1280	320	160	160
7	27.1	Ж	68	Житель Кавказа	Med+	640	80	40	40
8	29.1	М	47	Житель Кавказа	Med+	1280	80	160	80
9	33.1	М	59	Житель Кавказа	Med+	1280	640	320	320
10	42.1	М	58	Житель Кавказа	Med+	2560	1280	640	320
11	49.2	Ж	50	Житель Центра России	Med+	1280	320	320	160
12	28.1	М	67	Житель Кавказа	Med+	1280	320	160	80
13	39.2	Ж	30	Житель Центра России	Med+	80	10 ^г	10–	10–
Средние геометрические значения титров антител						835,5	157,3	92,3	63,5
Больные РНГ, не имеющие в образцах LMP1 Сао-делецию									
14	Lg115.1	Ж	49	Житель Центра России	B95.8/A	1280	320	320	–
15	Lg127.2	Ж	54	Житель Центра России	B95.8/A	320	40	80	–
16	11.2	М	68	Житель Центра России	Med–	1280	320	160	160
17	16.3	М	52	Житель Кавказа	B95.8/A	1280	320	160	160
18	37.1	Ж	51	Житель Центра России	Med–	1280	640	40	160
19	12.2	Ж	46	Житель Кавказа	Med–	1280	320	320	160
20	47.2	М	50	Житель Центра России	B95.8/A	1280	320	320	320
21	42.2	М	35	Житель Кавказа	Med–	2560	1280	640	320
22	39.1	Ж	30	Житель Центра России	Med–	80	10–	10–	10–
23	51.2	М	52	Житель Центра России	NC	80	10	10	10–
24	20.2	М	42	Житель Центра России	NC	640	320	160	160
Средние геометрические значения титров антител						681,6	138,2	88,9	60,4

^а В графе «Код больного» после указанного кода цифрами 1, 2 и 3 обозначены источники исследуемого материала: 1 — опухоль; 2 — кровь; 3 — клетки слювы из полости рта.^б Этническую принадлежность узнавали со слов больного.^в Титры антител к ВЭБ — последние разведения сыворотки/плазмы, в которых методом непрямой иммунофлюоресценции обнаружены антитела к соответствующему антигену вируса.^г В 10-кратном разведении сыворотки/плазмы вирус-специфические антитела не обнаружены.

Таблица 3

Варианты *LMP1*, этническая принадлежность и титры антител к ВЭБ у больных ДОПР^а

№ п/п	Код больного	Пол	Возраст, годы	Этническая принадлежность ^б	Варианты <i>LMP1</i>	Титры антител к ВЭБ ^в			
						IgG		IgA	
						ВКА	РА	ВКА	РА
Больные ДОПР, имеющие в образцах <i>LMP1</i> Сао-делецию									
1	1.1	М	53	Житель Центра России	Med+	80	10– ^г	10–	–
2	18.2	М	57	Житель Центра России	China1	160	10–	10–	10–
3	53.2	М	54	Житель Центра России	China1	40	10–	10–	10–
4	55.1	М	48	Житель Центра России	China1	20	10–	10–	10–
5	56.1	Ж	63	Житель Центра России	China1	80	10–	10–	10–
6	57.2	М	53	Житель Центра России	China1	80	10–	10–	10–
7	58.2	М	52	Житель Центра России	China1	10–	10–	10–	10–
Средние геометрические значения титров антител						35,1	–	–	–
Больные ДОПР, не имеющие в образцах <i>LMP1</i> Сао-делецию									
8	25.1	М	52	Житель Центра России	B95.8/A	10–	10–	10–	10–
9	35.2	М	61	Житель Кавказа	Med-	80	40	10–	10–
10	58.1	М	60	Житель Центра России	NC	10–	10–	10–	10–
11	36.2	М	47	Житель Центра России	Med–	40	10–	10–	10–
12	52.1	М	50	Житель Кавказа	NC	80	20	10–	10–
13	10.1	Ж	55	Житель Центра России	NC	160	10–	10–	10–
14	19.2	М	53	Житель Центра России	B95.8/A	80	10–	10–	10–
Средние геометрические значения титров антител						22,9	2,6	–	–

^а В графе «Код больного» после указанного кода цифрами 1, 2 и 3 обозначены источники исследуемого материала: 1 — опухоль; 2 — кровь; 3 — клетки смыва из полости рта.

^б Этническую принадлежность узнавали со слов больного.

^в Титры антител к ВЭБ — последние разведения сыворотки/плазмы, в которых методом непрямой иммунофлуоресценции обнаружены антитела к соответствующим антигенам вируса.

^г В 10-кратном разведении сыворотки/плазмы вирус-специфические антитела не обнаружены.

каждую из групп больных РНГ и ДОПР мы разбили на 2 подгруппы в зависимости от наличия или отсутствия в тестируемом материале вариантов *LMP1* с Сао-мутацией (табл. 2, 3). Последняя, как известно, обеспечивает вирусу выраженный онкогенный потенциал.

Результаты исследования показали, что у больных РНГ с вариантами *LMP1*Сао+ (China1 или Med+) клинические проявления болезни не были более тяжелыми,

чем в группе больных, у которых Сао-делеция в *LMP1* отсутствовала: в обеих группах доминировали больные с 3–4-й стадиями болезни и со сходными показателями TNM (данные не представлены). Эти наблюдения, скорее всего, свидетельствуют о том, что развитие данной ВЭБ-ассоциированной опухоли (РНГ) не зависит от типа и степени дивергентности вариантов *LMP1*, персистирующих в организме больного. По-видимому, клиническая

характеристика болезни определяется комплексом других, не связанных с вирусом факторов.

Иммунофлуоресцентное изучение сывороток крови для выявления вирус-специфических антител показало, что средние геометрические значения (СГЗ) титров антител классов IgG к ВКА и РА у больных РНГ были в десятки раз выше, чем у пациентов с ДОПР ($p < 0,001$); это подтверждает вирусную природу РНГ. Антитела класса IgA к ВКА и РА, наличие которых особенно характерно для больных РНГ, у пациентов с ДОПР полностью отсутствовали. В группе больных РНГ с LMP1Caо+ СГЗ титров антител, хотя и были незначительно выше, чем у больных РНГ с LMP1Caо-, различия эти были статистически незначимыми (см. табл. 2).

У пациентов с ДОПР наличие или отсутствие Сао-делеции в амплифицированных образцах LMP1 также не отражалось ни на клинических проявлениях болезни, ни на титрах антител к антигенам вируса (см. табл. 3). Значения последних в обеих группах пациентов с ДОПР были чрезвычайно низкими, что характерно для заболеваний, не ассоциированных с ВЭБ.

Как уже было упомянуто ранее, для вариантов LMP1 характерен высокий уровень полиморфизма (дивергентности). При этом, по данным большинства авторов, определенный генетический вариант LMP1 не связан с конкретным типом ВЭБ-ассоциированной патологии, но достаточно прочно сцеплен с географическим регионом и/или этнической принадлежностью популяции [24]. В наших исследованиях мы впервые обнаружили, что РНГ с высоко туморогенными вариантами LMP1Caо+ (China1 и Med+) чаще встречаются у представителей народов Кавказа — 69,2% (у 9 из 13; см. табл. 2). Те же высоко туморогенные варианты LMP1Caо+ у представителей центральной части России выявляются исключительно в группе пациентов с ДОПР — 100% (у 7 из 7; см. табл. 3).

Следует отметить, что в группах больных РНГ и пациентов с ДОПР варианты LMP1, не обладающие Сао-мутацией (B95.5, B95.8/A, Med-, NC), доминировали среди россиян из центральной части страны (72,7 и 71,4% соответственно). Полученные данные, по-видимому, свидетельствуют о генетической предрасположенности народов Кавказа к заболеванию РНГ, особенно ассоциированных с Сао-делецированными вариантами LMP1 ВЭБ. Нельзя исключить, однако, что повышенная заболеваемость РНГ у этих народов может быть также обусловлена воздействием определенных факторов окружающей среды, местными вредными привычками и т. д. Высказанные предположения следует подтвердить данными эпидемиологического наблюдения и более высокой репрезентативностью клинического материала в вирусологических и молекулярно-биологических исследованиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В наших исследованиях, проведенных в одном из неэндемичных по РНГ регионов мира — России, впервые показано, что в биологическом материале, полученном у больных со злокачественными новообразованиями полости рта (РНГ или ДОПР), выявлены высоко дивергентные варианты LMP1 ВЭБ. Чем обусловлено наличие этих вариантов LMP1 у больных ДОПР — патологий, в отличие

от РНГ, не ассоциированных с ВЭБ, остается неясным и является предметом дальнейшего изучения.

Кроме того, впервые показано, что наличие у больных РНГ и пациентов с ДОПР вариантов LMP1Caо+, обладающих повышенной туморогенностью, не коррелирует с более тяжелыми клиническими проявлениями болезни по сравнению с таковыми в группе больных, у которых Сао-делеция в LMP1 не обнаружена. Наличие у больных LMP1Caо+ не сопровождалось и повышенными титрами вирус-специфических антител, что в целом свидетельствует об отсутствии влияния LMP1 на опухолевый процесс.

Заслуживает внимания повышенная заболеваемость РНГ у представителей народов Кавказа, несмотря на одинаковую степень распространенности среди них и жителей центральной части России высоко дивергентных вариантов LMP1, в том числе с Сао-делецией.

Работа поддержана грантом РФФИ (проект № 10-04-00060а).

Авторы выражают благодарность А. В. Лихтенштейну за критическое обсуждение и полезные советы при написании рукописи и Н. А. Пироговой за консультацию при статистической обработке данных.

ЛИТЕРАТУРА

- Young L. S., Rickinson A. B. Epstein—Barr virus: 40 years on // Nat. Rev. Cancer. — 2004. — Vol. 4. — P. 757—768.
- Young L. S., Dawson C. W., Eliopoulos A. G. The expression and function of Epstein—Barr virus encoded latent genes // Mol. Pathol. — 2000. — Vol. 53. — P. 238—247.
- Moorthy R. K., Thorley-Lawson D. A. All three domains of the Epstein—Barr virus-encoded latent membrane protein LMP-1 are required for transformation of rat-1 fibroblasts // J. Virol. — 1993. — Vol. 67. — P. 1638—1646.
- Expression of the Epstein—Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice / Kulwichit W., Edwards R. H., Davenport E. M., Baskar J. F., Godfrey V., Raab-Traub N. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. — 1998. — Vol. 95. — P. 11 963—11 968.
- Sandvej K., Munch M., Hamilton-Dutoit S. Mutations in the Epstein—Barr virus latent membrane protein-1 (BNLF-1) gene in spontaneous lymphoblastoid cell lines: effect on in vitro transformation associated parameters and tumorigenicity in SCID and nude mice // Clin. Mol. Pathol. — 1996. — Vol. 49. — P. M290—M297.
- Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein—Barr virus / Dirmeier U., Neuhi-erl B., Kilger E., Reischbach G., Sandberg M. L., Hammerschmidt W. // Cancer Res. — 2003. — Vol. 63. — P. 2982—2989.
- Mainou B. A., Raab-Traub N. LMP1 strain variants: biological and molecular properties / Mainou B. A., Raab-Traub N. // J. Virol. — 2006. — Vol. 80. — P. 6458—6468.
- Epstein—Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling / Dawson C. W., Tramontain G., Eliopoulos A. G., Young L. S. // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278. — P. 3694—3704.
- Isolation and sequencing of the Epstein—Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma / Hu L. F., Zabarovsky E. R., Chen F., Cao S. L., Ernberg I., Klein G., Winberg G. // J. Gen. Virol. — 1991. — Vol. 72 (Pt 10). — P. 2399—2409.
- Sandvej K., Munch M., Hamilton-Dutoit S. Mutations in the Epstein—Barr virus latent membrane protein-1 (BNLF-1) gene in spontaneous lymphoblastoid cell lines: effect on in vitro transformation associated parameters and tumorigenicity in SCID and nude mice // Clin. Mol. Pathol. — 1996. — Vol. 49. — P. M290—M297.
- The molecular epidemiology and evolution of Epstein—Barr virus: sequence variation and genetic recombination in the latent membrane protein-1 gene / Walling D. M., Shebib N., Weaver S. C., Nichols C. M.,

Flaitz C. M., Webster-Cyriaque J. // *J. Infect. Dis.* — 1999. — Vol. 179. — P. 763—774.

12. Edwards R. H., Seillier-Moisewitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein—Barr virus strains // *Virology.* — 1999. — Vol. 261. — P. 79—95.

13. LMP1 expression is positively associated with metastasis of nasopharyngeal carcinoma: evidence from a meta-analysis / Zhao Y., Wang Y., Zeng S., Hu X. // *J. Clin. Pathol.* — 2012. — Vol. 65. — P. 41—45.

14. Current understanding and management of nasopharyngeal carcinoma / Yoshizaki T., Ito M., Muroso S., Wakisaka N., Kondo S., Endo K. // *Auris Nasus Larynx.* — 2011. — Vol. 14. — P. 171—175.

15. Epstein—Barr Virus latent membrane protein 1 induces Snail and epithelial-mesenchymal transition in metastatic nasopharyngeal carcinoma / Horikawa T., Yoshizaki T., Kondo S., Furukawa M., Kaizaki Y., Pagano J. S. // *Br. J. Cancer.* — 2011. — Vol. 104. — P. 1160—1167.

16. Epstein—Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Induces Cancer Stem/Progenitor-Like Cells in Nasopharyngeal Epithelial cell lines / Kondo S., Wakisawa N., Muramatsu M., Zen Y., Endo K., Muroso S., Sugimoto H., Yamaoka S., Pagano J. S., Yoshizaki T. // *J. Virol.* — 2011. — Vol. 85, N 21. — P. 11 255—11 264.

17. Detection of Stage I nasopharyngeal carcinoma by serologic screening and clinical examination / Ji M. F., Yu Y. L., Cheng W. M., Zong Y. S., Ng P. S., Chua D. T., Ng M. H. // *Chin. J. Cancer.* — 2011. — Vol. 30. — P. 120—123.

18. Diagnostic value of Epstein—Barr virus capsid antigen-IgA in nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis / Li S., Deng Y., Li X., Chen Q. P., Liao X. C., Qin X. // *Chin. Med. J. (Engl.).* — 2010. — Vol. 123. — P. 1201—1205.

19. Combined determination of Epstein—Barr virus-related antibodies and antigens for diagnosis of nasopharyngeal carcinoma / Luo Y. L.,

Ou G. P., Chi P. D., Liang Y. N., Liu Y. H., Huang M. Y. // *Ai. Zhong.* — 2009. — Vol. 28. — P. 76—78.

20. Epstein—Barr virus detection in nasopharyngeal carcinoma: implications in a low-risk area / Breda E., Catarino R. J., Azevedo I., Lobo M., Monteiro E., Medeiros R. // *Braz. J. Otorhinolaryngol.* — 2010. — Vol. 76. — P. 310—315.

21. Epstein—Barr viral serology in nasopharyngeal carcinoma patients in the USSR and Cuba, and its value for differential diagnosis of the disease / Gurtsevitch V., Ruiz R., Stepina V., Plachov I., Le Riverend E., Glazkova T., Lavoue M. F., Paches A., Aliev B., Mazurenko N. // *Int. J. Cancer.* — 1986. — Vol. 37. — P. 375—381.

22. Гуморальный иммунный ответ к вирусу Эпштейна—Барр в диагностике рака носоглотки (Обзор литературы и 30-летний опыт собственных исследований) / Гурцевич В. Э., Степина В. Н., Сенюта Н. Б., Гончарова Е. В., Щербак Л. Н., Душенькина Т. Е., Репкина И. А., Белоусова Н. В., Кондратьева Т. Т., Алиева С. Б., Ахундов А. А., Матякин Е. Г., Поддубный Б. К., Пробатова Н. А., Пачес А. И. // *Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН.* — 2011. — Т. 22., № 2. — С. 20—29.

23. Sequence analysis of the Epstein—Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 gene and promoter region: identification of four variants among wild-type EBV isolates / Sandvej K., Gratama J. W., Munch M., Zhou X. G., Bolhuis R. L., Andresen B. S., Gregersen N., Hamilton-Dutoit S. // *Blood.* — 1997. — Vol. 90. — P. 323—330.

24. Epstein—Barr virus strains defined by the latent membrane protein 1 sequence characterize Thai ethnic groups / Saechan V., Settheetham-Ishida W., Kimura R., Tiwawech D., Mitarnun W., Ishida Y. // *J. Gen. Virol.* — 2010. — Vol. 91. — P. 2054—2061.

Поступила 03.02.2012

Larisa Sergeyevna Yakovleva¹, Natalya Borisovna Senyuta²,
Vera Nikolayevna Stepina³, Elena Vasilievna Goncharova⁴,
Liana Nodarovna Scherbak⁵, Samir Makhabbatogly Jabbarov⁶,
Vladimir Eduardovich Gurtsevich⁷

EPSTEIN—BARR VIRUS IN PATIENTS WITH NASOPHARYNGEAL CARCINOMA: *LMP1* VARIANTS, ANTIBODY RESPONSE AND CLINICAL MANIFESTATIONS

¹ MD, PhD, DSc, Senior Researcher, Viral Carcinogenesis Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

² MD, PhD, Leading Researcher, Viral Carcinogenesis Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

³ MD, PhD, DSc, Senior Researcher, Viral Carcinogenesis Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁴ MD, PhD, Researcher, Viral Carcinogenesis Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁵ MSc, PhD, Researcher, Viral Carcinogenesis Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁶ MD, Postgraduate Student, Respiratory and Digestive Tract Tumor Department, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁷ MD, PhD, DSc, Professor, RF Honored Scientist, Head, Viral Carcinogenesis Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

Address for correspondence: Gurtsevich Vladimir Eduardovich, Viral Carcinogenesis Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS, 24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478; e-mail: vladgurtsevich@yahoo.com

The purpose of this study was to analyze polymorphism (divergence) of Epstein—Barr virus *LMP1* oncogene in patients with nasopharyngeal carcinoma and control patients with other oral tumors, infectious mononucleosis or blood donors. In particular it was important to clarify whether *LMP1* variants with various degrees of polymorphism (divergence) may influence clinical manifestations of disease and antibody response to Epstein—Barr virus antigens. We analyzed tumor tissue, blood or oral swab samples in nasopharyngeal cancer patients and those with other oral tumors, infectious mononucleosis and healthy blood donors. Samples of the *LMP1* C-terminal regions obtained by PCR (25 from nasopharyngeal cancer patients, 14 from patients with different oral tumors, 10 from patients with infectious mononucleosis and 15 from blood donors) were subjected to sequence analysis. Blood plasma from all individuals investigated was tested for IgG and IgA antibodies to capsid and early virus antigens. It was found for the first time that *LMP1* highly divergent variants were seen at an equal rate in patients with nasopharyngeal carcinoma and other oral tumors, i. e. tumors associated and not associated with Epstein—Barr virus, respectively. None of the patients with infectious mononucleosis or blood donors (except one) had highly divergent variants. In patients with nasopharyngeal carcinoma or other oral tumors the presence of *LMP1* variants with Cao deletion (demonstrating higher tumorigenic activity as compared with other *LMP1* variants) showed no correlation with either more advanced disease or elevated virus-specific antibody titers. These findings suggest that highly tumorigenic *LMP1* variants have no effect on neoplastic disease course. We were also the first to demonstrate that nasopharyngeal carcinoma incidence was higher in natives of the Caucasus as compared with inhabitants of Central Russia.

Key words: Epstein—Barr virus, nasopharyngeal carcinoma, latent membrane protein 1 (*LMP1*), gene sequencing, *LMP1* polymorphism.

ДИСКУССИЯ

*Алентина Ивановна Павловская¹, Татьяна Тихоновна Кондратьева²,
Надежда Павловна Велижева³, Семен Венедиктович Петров⁴,
Надежда Васильевна Балатенко⁵, Сомасунгарам Субраманиан⁶*

СОВРЕМЕННЫЕ ПРИНЦИПЫ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО НА МАЛОМ БИОПСИЙНОМ И ЦИТОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

¹ К. м. н., ведущий научный сотрудник, отдел патологической анатомии опухолей
НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН
(115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

² Д. м. н., ведущий научный сотрудник, лаборатория клинической цитологии
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

³ К. м. н., лаборатория клеточного иммунитета НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁴ Профессор, г. м. н., руководитель, отдел молекулярной патологии, Республиканский клинический
онкологический диспансер Министерства здравоохранения Республики Татарстан
(420029, РФ, г. Казань, ул. Сибирский Тракт, г. 29)

⁵ Заведующая, патологоанатомическое отделение, Республиканский клинический онкологический диспансер
Министерства здравоохранения Республики Татарстан (420029, РФ, г. Казань, ул. Сибирский Тракт, г. 29)

⁶ Директор, Евразийская федерация онкологии; старший научный сотрудник, отделение биотерапии опухолей
НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН
(115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

Адрес для переписки: 115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, НИИ экспериментальной диагностики и
терапии опухолей ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН, лаборатория клеточного иммунитета,
Велижева Надежда Павловна; e-mail: nadezhda.velizheva@gmail.com

Морфологическая диагностика немелкоклеточного рака легкого с определением гистологического типа и подтипа опухоли позволяет определять оптимальную тактику лечения больных. Представлены обоснование необходимости субклассифицирования и алгоритм диагностики рака легкого на малом биопсийном и цитологическом материале с применением в трудных случаях гистохимических и иммуногистохимических методов исследования с целью достижения максимальной точности морфологического диагноза.

Ключевые слова: рак легкого, алгоритм диагностики, TTF-1 / p63, аденокарцинома, плоскоклеточный рак.

Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) — гетерогенная группа опухолей, составляющая 80% злокачественных новообразований данной локализации. К этой группе относятся аденокарцинома, плоскоклеточный рак, крупноклеточный рак и их многочисленные подтипы [1]. Во многих странах мира самым частым гистологическим типом рака легкого является аденокарцинома [2—5].

Успешное применение таргетной терапии при аденокарциноме легкого принципиально изменило подход к морфологической диагностике НМРЛ [6—10]. Особую актуальность приобрела дифференциальная диагностика аденокарциномы и плоскоклеточного рака легкого [7; 11—14]. Она имеет огромное практическое значение, поскольку ангиогенная терапия бевацизумабом (моноклональные антитела против фактора роста эндотелия, VEGF) при плоскоклеточном раке легкого сопряжена с риском потенциально смертельного кровотечения [15; 16].

В ряде исследований показано, что некоторые генетические повреждения, в частности мутации в гене рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) или в гене киназы анапластической лимфомы (EML4-ALK), встречаются преимущественно при аденокарциноме легкого [6; 17—20] и являются важными предиктивными и прогностическими факторами, определяющими эффективность лекарственной противоопухолевой терапии [9; 10; 21—23].

Известно, что у большинства больных раком легкого (70—80%) на момент обращения к онкологу диагностируются местнораспространенный процесс или отдаленные метастазы, что делает опухоль нерезектабельной, но оставляет возможности для химиотерапевтического лечения [15]. В таких случаях морфологическая верификация гистологического типа рака легкого возможна зачастую только на малом биопсийном или цитологическом материале [12; 24].

Результативность морфологического исследования с рутинной окраской срезов опухоли гематоксилином и эозином (азур-эозиновыми смесями для цитологического исследования) находится в прямой зависимости от качества материала. На достаточном по объему сохранном (недеформированном) материале диагностика не вызывает затруднений. Однако присущая раку легкого гистологическая гетерогенность, низкая степень дифференцировки, механическая деформация материала при его получении снижают информативность биопсийного и цитологического материала. Примерно в 25% случаев субклассифицирование рака легкого на основании рутинного морфологического исследования оказывается невозможным [15]. Морфологический диагноз в подобных случаях сводится к формальному заключению «НМРЛ без дополнительных характеристик» [25]. Очевидно, что такое заключение не отвечает современной терапевтической стратегии.

В связи с необходимостью точной субклассификации рака легкого, и в частности дифференциальной диагностики аденокарциномы и плоскоклеточного рака, разработана стандартизованная схема морфологической диагностики по малому биопсийному и цитологическому материалу с применением при необходимости дополнительных исследований: гистохимического (окраска на слизь), иммуногистохимического и молекулярно-генетического. Данная схема рекомендована группой по изучению рака легкого и отражена в новой международной мультидисциплинарной классификации аденокарцином легкого, созданной экспертами Международной ассоциации по изучению рака легкого (IASLC), Американского торакального общества (ATS) и Европейского общества пульмонологов, и состоит из трех последовательных этапов [26].

АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ РАКА ЛЕГКОГО НА МАЛОМ БИОПСИЙНОМ ИЛИ ЦИТОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Первый этап

При наличии четких светооптических признаков железистой или плоскоклеточной дифференцировки опухоли ее классифицируют как аденокарциному или плоскоклеточный рак соответственно (рис. 1, А—Б; рис. 2, А—Г).

При наличии светооптических признаков нейроэндокринной дифференцировки опухоли дают заключение «мелкоклеточный рак» или «немелкоклеточный рак, возможно, крупноклеточный нейроэндокринный рак» (рис. 1, В; рис. 2, Д). Подтверждают диагноз с помощью последующего иммуногистохимического выявления маркеров нейроэндокринной дифференцировки: синаптофизина, хромогранина А, CD 56 (рис. 1, Г).

В отсутствие четких светооптических признаков железистой или плоскоклеточной дифференцировки дают заключение «немелкоклеточный рак без дополнительных характеристик».

Второй этап

Морфологический диагноз при наличии заключения «немелкоклеточный рак без дополнительных характеристик» в дальнейшем может быть уточнен с помощью гистохимического (окраска на слизь: PAS-реакция или окраска муцикармином), иммуногистохимического или молекулярно-генетического методов.

При выявлении слизи или экспрессии опухолевыми клетками железистого маркера ТТФ-1 и в отсутствие маркеров плоскоклеточной дифференцировки (p63 и/или СК 5/6) ставят диагноз «немелкоклеточный рак, вероятнее всего, аденокарцинома» (рис. 1, Д—З; рис. 2, Е—И).

Если результаты иммуногистохимического исследования противоположны (не экспрессируется ТТФ-1, экспрессируется p63 и/или СК 5/6) и в клетках отсутствует слизь, ставят диагноз «немелкоклеточный рак, вероятнее всего плоскоклеточный рак» (рис. 1, И—К; рис. 2, К—Л).

Если экспрессия ТТФ-1 отсутствует, а экспрессия плоскоклеточных маркеров слабая или фокальная, опухоль классифицируют как «немелкоклеточный рак без дополнительных характеристик». Если опухоль экспрессирует ТТФ-1 и одновременно слабо или фокально экспрессирует p63 и/или СК 5/6, ставят диагноз «аденокарцинома». Важно отметить, около трети аденокарцином в отсутствие светооптических признаков плоскоклеточной дифференцировки проявляют значительную антигенную гетерогенность по всем плоскоклеточным маркерам: частота экспрессии p63 составляет 18—32%, цитокератинов СК 5/6 — 15—18%, СК 34βЕ12 — до 82%. Это объясняют коэкспрессией опухолевыми клетками нескольких дифференцировочных маркеров [11; 19; 27; 28].

В случае четкой экспрессии «железистого» и «плоскоклеточного» маркеров разными популяциями опухолевых клеток опухоль классифицируют как «немелкоклеточный рак без дополнительных характеристик, возможно, железисто-плоскоклеточный рак». Однако морфологическая диагностика этого гистологического типа рака легкого возможна только при исследовании удаленной опухоли и в том случае, если доля меньшего компонента не менее 10%.

В случае рака легкого с одновременным наличием саркоматоидной (выраженный ядерный плеоморфизм, наличие веретеновидных и/или гигантских опухолевых клеток) и железистой или плоскоклеточной дифференцировки ставят диагноз «аденокарцинома» или «плоскоклеточный рак» (рис. 1, Л—М; рис. 2, М). В отсутствие признаков железистой или плоскоклеточной дифференцировки опухоль классифицируют как «низкодиффе-

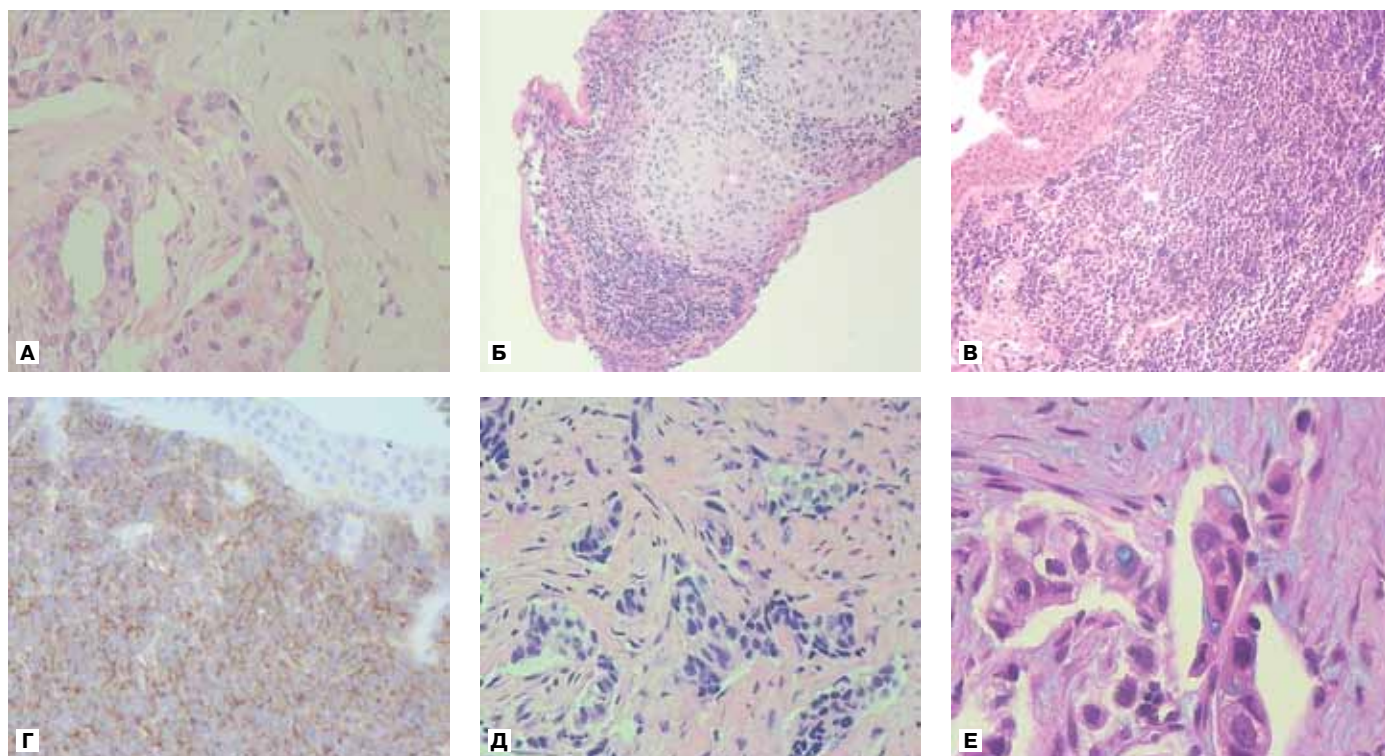


Рисунок 1. Гистологическая и иммуногистохимическая картина рака легкого.

А. Светооптические признаки железистой дифференцировки (окраска гематоксилином и эозином, $\times 250$). **Б.** Светооптические признаки плоскоклеточной дифференцировки (окраска гематоксилином и эозином, $\times 150$). **В.** Светооптические признаки нейроэндокринной дифференцировки (окраска гематоксилином и эозином, $\times 150$). **Г.** Экспрессия нейроэндокринного маркера CD 56 опухолевыми клетками (иммуногистохимическое исследование, $\times 150$). **Д.** Комплексы раковых клеток без четких светооптических признаков железистой дифференцировки (окраска гематоксилином и эозином, $\times 250$). **Е.** В цитоплазме отдельных опухолевых клеток выявляется слизь (окраска по Крейбергу, $\times 400$).

ренцированный НМРЛ с гигантскими и/или веретеновидными опухолевыми клетками».

В отсутствие экспрессии как железистых, так и плоскоклеточных маркеров ставят диагноз «немелкоклеточный рак без дополнительных характеристик».

Молекулярно-генетическое определение мутаций EGFR рекомендуют, если поставлены следующие морфологические диагнозы: (1) классическая «аденокарцинома»; (2) «немелкоклеточный рак, вероятно, аденокарцинома»; (3) «немелкоклеточный рак без дополнительных характеристик»; (4) «немелкоклеточный рак, возможно, железисто-плоскоклеточный рак». Наличие мутаций EGFR свидетельствует в пользу принадлежности опухоли к аденокарциноме, а не к плоскоклеточному раку [6; 17; 26].

Третий этап

Если поставлен диагноз «НМРЛ без дополнительных характеристик» и имеющийся материал не пригоден для проведения молекулярно-генетического исследования, может быть рекомендована повторная биопсия опухоли.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дополнительные гистохимическое и иммуногистохимическое исследования показаны, если в опухоли отсутствуют четкие светооптические признаки железистой или плоскоклеточной дифференцировки.

Для иммуногистохимического исследования достаточно минимальной, но информативной панели антител: TTF-1 в качестве железистого маркера и p63 и/или СК 5/6 в качестве плоскоклеточного. Уменьшение числа срезов позволяет сохранить материал для молекулярно-генетического исследования.

В качестве объекта иммуноцитохимического исследования может быть использован материал, полученный при бронхоскопии, тонкоигольной аспирационной биопсии, а также экссудат при опухолевом плеврите [12; 29—35].

ОБСУЖДЕНИЕ

К сожалению, на практике дополнительные методы исследования не всегда доступны, и морфологический диагноз нередко строится только на основании светооптического исследования опухоли. Большую пользу в подобных случаях может принести тесное взаимодействие морфолога с другими специалистами, участвующими в диагностическом процессе.

Цитологическое и гистологическое исследования являются равноправными методами верификации гистологического типа рака легкого. Цитологическое исследование позволяет дифференцировать аденокарциному и плоскоклеточный рак, особенно полезно у неоперабельных больных [12; 19; 27—29; 36]. Современные возмож-

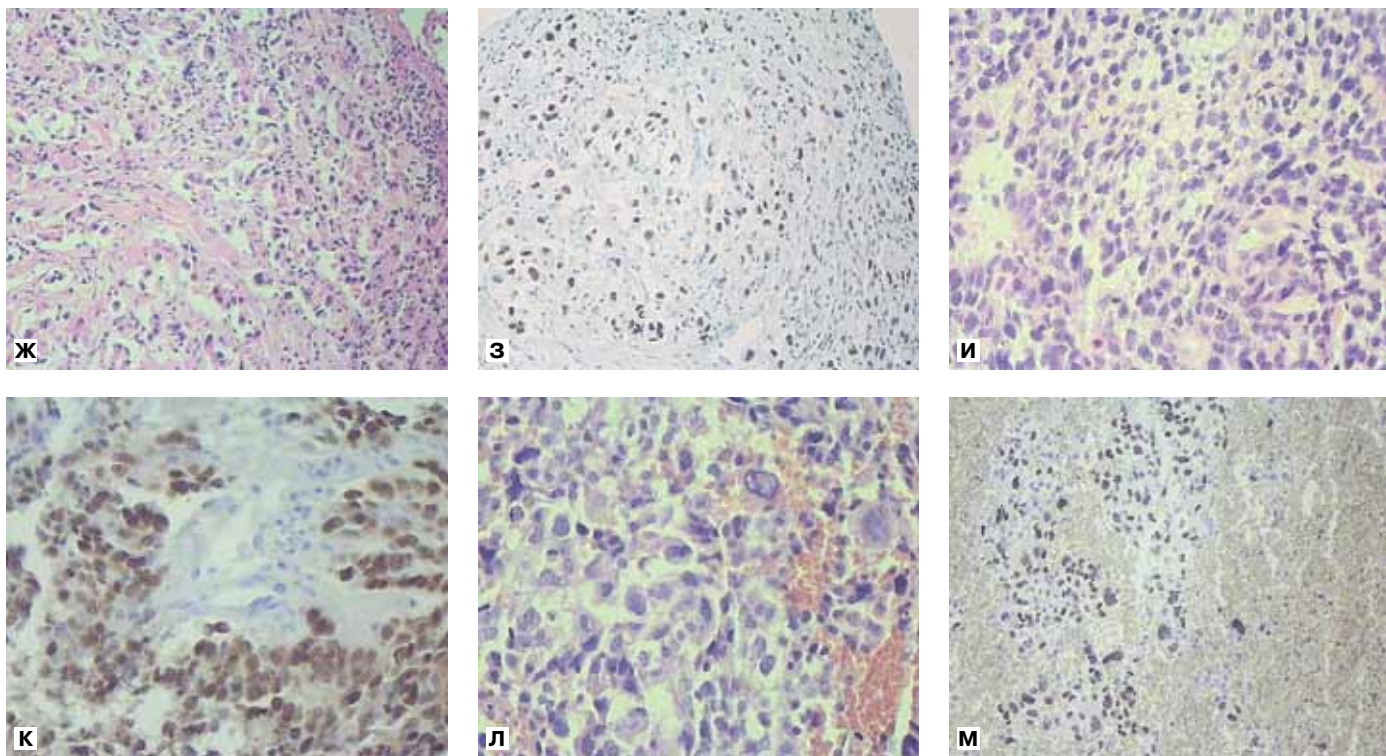


Рисунок 1. (Окончание)

Ж. Дискретное расположение опухолевых клеток в предполагаемой аденокарциноме (окраска гематоксилином и эозином, $\times 250$). **З.** Ядерная экспрессия железистого маркера TTF-1 опухолевыми клетками (иммуногистохимическое исследование, $\times 150$). **И.** Сплотный рост опухолевых клеток пластинчатого вида; предполагаемый диагноз «плоскоклеточный рак» (окраска гематоксилином и эозином, $\times 250$). **К.** Ядерная экспрессия плоскоклеточного маркера p63 опухолевыми клетками (иммуногистохимическое исследование, $\times 250$). **Л.** Рак с признаками саркоматоидной дифференцировки: ядерный плеоморфизм, наличие гигантских опухолевых клеток (окраска гематоксилином и эозином, $\times 250$). **М.** Аденокарцинома с саркоматоидными признаками: ядерная экспрессия опухолевыми клетками TTF-1 (иммуногистохимическое исследование, $\times 150$).

ности этого метода позволяют установить диагноз рака легкого и дифференцировать его варианты не менее чем у 80% больных. Чувствительность цитологического исследования при диагностике рака легкого, по данным разных авторов, варьирует от 56 до 90%, а специфичность приближается к 100% [24; 37]. На результативность метода влияют степень дифференцировки опухоли, качество материала, его объем (клеточность), сохранность и способы окраски. Следует подчеркнуть важную роль профессиональной подготовки цитопатолога.

Использование иммуногистохимического исследования повышает точность цитологического заключения, дает возможность судить о гистологическом типе опухоли (аденокарцинома или плоскоклеточный рак) почти в 100% случаев [31].

Одновременное применение гистологического и цитологического исследований подразумевает тесное взаимодействие морфологов, совместное обсуждение полученных результатов и разрешение возникающих разногласий с целью достижения максимальной точности морфологического диагноза.

Подводя итоги, следует подчеркнуть, что в современных условиях основным методом диагностики рака легкого остается гистологическая верификация диагноза, однако все большее значение приобретает мультидисци-

плинарная диагностика, подразумевающая тесное взаимодействие специалистов разного профиля [26].

Работа выполнена в рамках проекта «Гистология», направленного на улучшение диагностики рака легкого в Российской Федерации и разработанного Евразийской федерацией онкологии в партнерстве с компанией «Эли Лилли».

ЛИТЕРАТУРА

1. Dail and Hammar's Pulmonary Pathology / Flieder D. B., Hammar S. P., Tomaszefski J. F., Cagle P. T., Farver C. F., Fraire A. E. (eds.). — 3rd ed. — Springer Science + Business Media: LLC, 2008. — Vol. II. — P. 216—308.
2. Distinctive characteristics of non-smallcell lung cancer (NSCLC) in the young: A surveillance, epidemiology, and end results (SEER) analysis / Subramanian J., Morgensztern D., Goodgame B., Goodgame B., Baggstrom M. Q., Gao F., Piccirillo J., Govindan R. // J. Thorac. Oncol. — 2010. — Vol. 5, N 1. — P. 23—28.
3. The prognostic and predictive role of histology in advanced non-small cell lung cancer: a literature review / Hirsch F. R., Spreafico A., Novello S., Wood M. D., Simms L., Papotti M. // J. Thorac. Oncol. — 2008. — Vol. 3, N 12. — P. 1468—1481.
4. Prognostic factors in lung cancer in a defined geographical area over two decades with a special emphasis on gender / Svensson G., Ewers S. B., Ohlsson O., Olsson H. // Clin. Respir. J. — 2012. — doi: 10.1111/j.1752-699X.2012.00289.x. [Epub ahead of print].
5. Does Lung Adenocarcinoma Subtype Predict Patient Survival?: A clinicopathologic Study Based on the New International Association

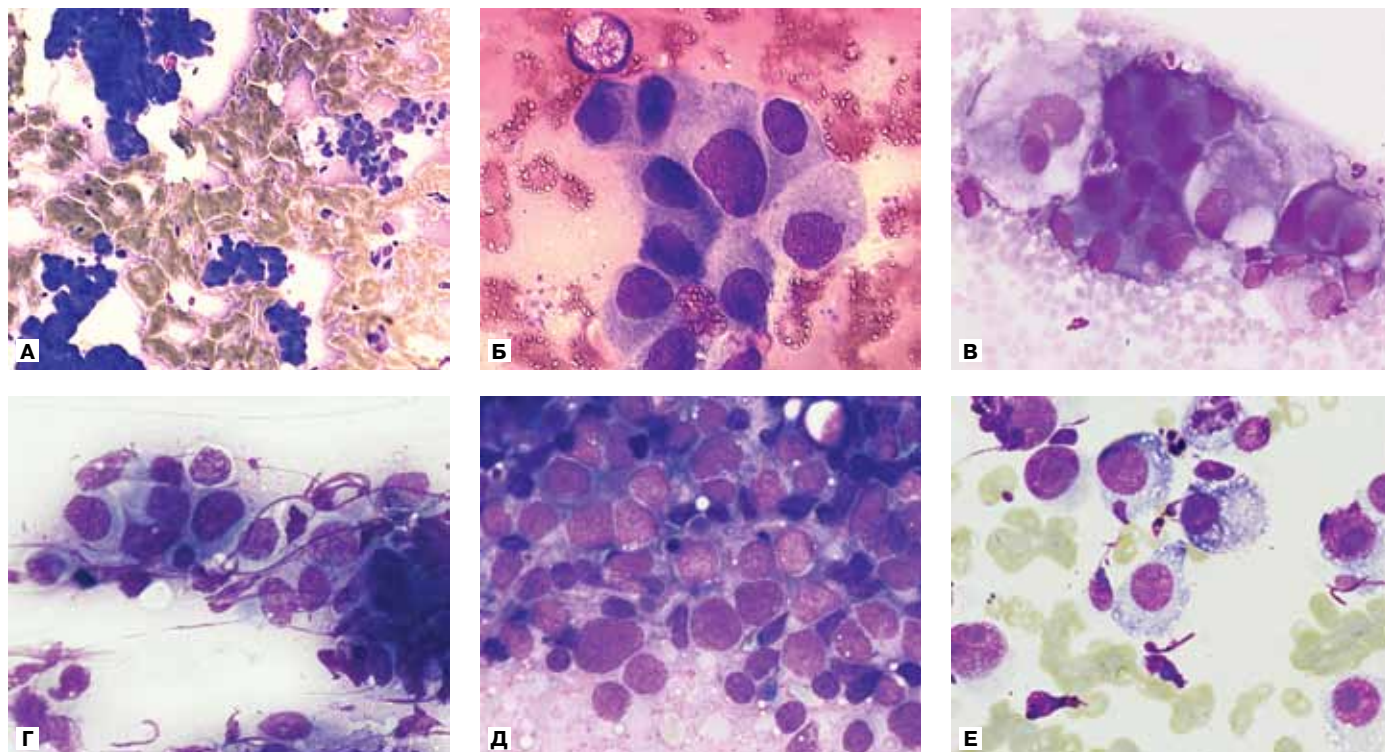


Рисунок 2. Цитологическая картина рака легкого (окраска по Лейшману).

А. Светооптические признаки железистой дифференцировки (×200). **Б.** Клетки кубического эпителия с нежной светлой цитоплазмой без видимого слизиобразования (×1000). **В.** Группа клеток аденокарциномы с отчетливыми признаками внутриклеточного слизиобразования (×1000). **Г.** Группа клеток рака с признаками эпидермоидной дифференцировки, выраженная гиперхромия ядер с часто различной структурой хроматина; отдельные клетки с признаками кератинизации (×1000). **Д.** Мелкоклеточный рак: солидно расположенные недифференцированные опухолевые клетки с узким плотным ободком цитоплазмы, хроматином неоднородной структуры, частыми митозами (×1000). **Е.** Низкодифференцированный НМРЛ, вероятно, аденокарцинома: вакуолизованные клетки с эксцентрично расположенными ядрами, внутриклеточным слизиобразованием, встречаются митозы (×1000).

for the Study of Lung Cancer / American Thoracic Society / European Respiratory Society International Multidisciplinary Lung Adenocarcinoma Classification / Russell P. A., Wainer Z., Wright G. M., Daniels M., Conron M., Williams R. A. // *J. Thorac. Oncol.* — 2011. — Vol. 6, N 9. — P. 1496—1504.

6. Epidermal Growth Factor Receptor-Related Tumor Markers and Clinical Outcomes with Erlotinib in Non-small Cell Lung Cancer An Analysis of Patients from German Centers in the TRUST Study / Schneider C. P., Heigener D., Schott-von-Romer K., Gutz S., Laack E., Digel W., Guschall W. R., Franke A., Bodenstern H., Schmidtgen C., Reck M. // *J. Thorac. Oncol.* — 2008. — Vol. 3, N 12. — P. 1446—1453.

7. Pemetrexed with or without Matuzumab as Second-Line Treatment for Patients with Stage IIIB/IV Non-small Cell Lung Cancer / Schiller J. H., Von Pawel J., Schutt P., Ansari R. H., Thomas M., Saleh M., McCroskey R. D., Pfeifer W., Marsland T. A., Kloecker G. H., Sebastian M., Pirker R., Kurek R., Beadman C., Socinski M. A. // *J. Thorac. Oncol.* — 2010. — Vol. 5, N 12. — P. 1977—1985.

8. Lung cancer: Progress in diagnosis, staging and therapy / Spiro S. G., Tanner N. T., Silvestri G. A., Janes S. M., Lim E., Vansteenkiste J. F., Pirker R. // *Respirology.* — 2010. — Vol. 15, N 1. — P. 44—50.

9. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial / Pirker R., Pereira J. R., Szczesna A., von Pawel J., Krzakowski M., Ramlau R., Vynnychenko I., Park K., Yu C. T., Ganul V., Roh J. K., Bajetta E., O'Byrne K., de Marinis F., Eberhardt W., Goddemeier T., Emig M., Gatzemeier U. // *Lancet.* — 2009. — Vol. 373. — P. 1525—1531.

10. Pirker R., Filipits M. Targeted therapies in lung cancer // *Curr. Pharm. Des.* — 2009. — Vol. 15. — P. 188—206.

11. Ang D. C., Ghaffar H., Zakowski M. F. Expression of squamous markers in lung adenocarcinoma (AD): clinicopathologic and mole-

cular correlates, and implications for differentiation from squamous cell carcinoma (Sq CC) // *Mod. Pathol.* — 2010. — Vol. 23 (suppl.). — P. 396A—415A.

12. Subtyping of Non-small Cell Lung Carcinoma: A Comparison of Small Biopsy and Cytology Specimens / Sigel C. S., Moreira A. L., Travis W. D., Zakowski M. F., Thornton R. H., Riely G. J., Rekhtman N. // *J. Thorac. Oncol.* — 2011. — Vol. 6, N 11. — P. 1849—1856.

13. Mukhopadhyay S., Katzenstein A. L. Subclassification of Non-small Cell Lung Carcinomas Lacking Morphologic Differentiation on Biopsy Specimens: Utility of an Immunohistochemical Panel Containing TTF-1, Napsin A, p63, and CK5/6 // *Am. J. Surg. Pathol.* — 2011. — Vol. 35, N 1. — P. 15—25.

14. The differential efficacy of pemetrexed according to NSCLC histology: a review of two phase III studies / Scagliotti G., Hanna N., Fossella F., Sugarman K., Blatter J., Peterson P., Simms L., Shepherd F. A. // *Oncologist.* — 2009. — Vol. 14, N 3. — P. 253—263.

15. Optimal immunohistochemical markers for distinguishing lung adenocarcinomas from squamous cell carcinomas in small tumor samples / Terry J., Leung S., Laskin J., Leslie K. O., Gown A. M., Ionescu D. N. // *Am. J. Surg. Pathol.* — 2010. — Vol. 34, N 12. — P. 1805—1811.

16. Sandler A. Bevacizumab in non-small cell lung cancer // *Clin. Cancer Res.* — 2007. — Vol. 13, N 15. — P. s4613—s4616.

17. Prognostic and therapeutic implications of EGFR and KRAS mutations in resected lung adenocarcinoma / Marks J. L., Broderick S., Zhou Q., Chitale D., Li A. R., Zakowski M. F., Kris M. G., Rusch V. W., Azzoli C. G., Seshan V. E., Ladanyi M., Pao W. // *J. Thorac. Oncol.* — 2008. — Vol. 3, N 2. — P. 111—116.

18. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer / Kwak E. L., Bang Y. J., Camidge D. R., Shaw A. T., Solomon B., Maki

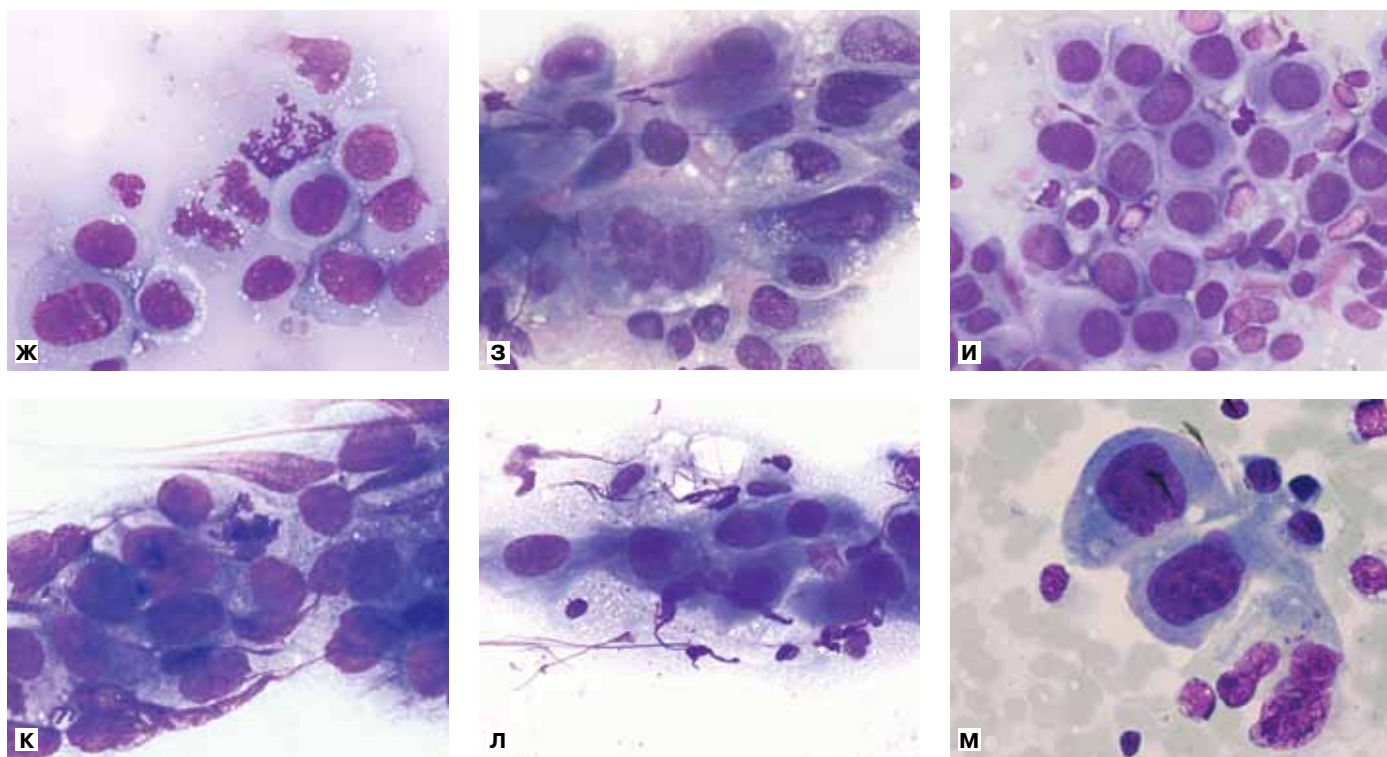


Рисунок 2. (Окончание)

Ж. То же, что на рис. Е ($\times 1000$). **З.** НМРЛ, вероятно, аденокарцинома: уплотненные опухолевые клетки с характерным стелящимся типом роста, вакуолями и нежным хроматином; в ядрах отчетливо визуализируются одиночные нуклеолы ($\times 1000$). Этот подтип аденокарциномы вызывает наибольшие трудности в дифференциальной диагностике с плоскоклеточным раком и является наиболее частой причиной расхождений цитологических и гистологических заключений. **И.** НМРЛ, вероятно, аденокарцинома: опухолевые клетки неправильной полигональной формы с широкой цитоплазмой и нежным хроматином, характеризуются солидным ростом; в ядрах отчетливо визуализируются одиночные нуклеолы ($\times 1000$). **К.** Низкодифференцированный НМРЛ, вероятно, плоскоклеточный рак: опухолевые клетки наслаиваются друг на друга, отмечается гиперхромия ядер с множественными мелкими нуклеолами, встречаются митозы ($\times 1000$). **Л.** Низкодифференцированный плоскоклеточный рак: соединение клеток по типу «мостиков» ($\times 1000$). **М.** Гигантские многоядерные клетки аденокарциномы с саркоматоидными признаками ($\times 1000$).

R. G., Ou S. H., Dezube B. J., Jänne P. A., Costa D. B., Varella-Garcia M., Kim W. H., Lynch T. J., Fidias P., Stubbs H., Engelman J. A., Sequist L. V., Tan W., Gandhi L., Mino-Kenudson M., Wei G. C., Shreeve S. M., Ratain M. J., Settleman J., Christensen J. G., Haber D. A., Wilner K., Salgia R., Shapiro G. I., Clark J. W., Iafrate A. J. // *N. Engl. J. Med.* — 2010. — Vol. 363, N 18. — P. 1693—1703.

19. Frequent ALK rearrangement and TTF-1/p63 co-expression in lung adenocarcinoma with signet-ring cell component / Yoshida A., Tsuta K., Watanabe S., Sekine I., Fukayama M., Tsuda H., Furuta K., Shibata T. // *Lung Cancer.* — 2011. — Vol. 72, N 3. — P. 309—315.

20. Horn L., Pao W. EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer // *J. Clin. Oncol.* — 2009. — Vol. 27, N 26. — P. 4232—4235.

21. Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis / Shaw A. T., Yeap B. Y., Solomon B. J., Riely G. J., Gainor J., Engelman J. A., Shapiro G. I., Costa D. B., Ou S. H., Butaney M., Salgia R., Maki R. G., Varella-Garcia M., Doebele R. C., Bang Y. J., Kulig K., Selaru P., Tang Y., Wilner K. D., Kwak E. L., Clark J. W., Iafrate A. J., Camidge D. R. // *Lancet Oncol.* — 2011. — Vol. 12, N 11. — P. 1004—1012.

22. Anaplastic lymphoma kinase translocation: a predictive biomarker of pemetrexed in patients with non-small cell lung cancer / Lee J. O., Kim T. M., Lee S. H., Kim D. W., Kim S., Jeon Y. K., Chung D. H., Kim W. H., Kim Y. T., Yang S. C., Kim Y. W., Heo D. S., Bang Y. J. // *J. Thorac. Oncol.* — 2011. — Vol. 6, N 9. — P. 1474—1480.

23. Rapid and dramatic radiographic and clinical response to an ALK inhibitor (crizotinib, PF02341066) in an ALK translocation-positive patient with non-small cell lung cancer / Ou S. H., Bazhenova L.,

Camidge D. R., Solomon B. J., Herman J., Kain T., Bang Y. J., Kwak E. L., Shaw A. T., Salgia R., Maki R. G., Clark J. W., Wilner K. D., Iafrate A. J. // *J. Thorac. Oncol.* — 2010. — Vol. 5, N 12. — P. 2044—2046.

24. Accuracy of fine needle aspiration cytology in the pathological typing of nonsmall cell lung cancer / Nizzoli R., Tiseo M., Gelsomino F., Bartolotti M., Majori M., Ferrari L., De Filippo M., Rindi G., Silini E. M., Guazzi A., Ardizzoni A. // *J. Thorac. Oncol.* — 2011. — Vol. 6, N 3. — P. 489—493.

25. Diagnosis of lung cancer by fiberoptic bronchoscopy: problems in the histological classification of non-small cell carcinomas / Chuang M. T., Marchevsky A., Teirstein A. S., Kirschner P. A., Kleinerman J. // *Thorax.* — 1984. — Vol. 39, N 3. — P. 175—178.

26. International Association for the Study of Lung Cancer / American Thoracic Society / European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma // *J. Thorac. Oncol.* — 2011. — Vol. 6, N 2 — P. 244—285.

27. Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens / Rekhman N., Ang D. C., Sima C. S., Travis W. D., Moreira A. L. // *Mod. Pathol.* — 2011. — Vol. 24, N 10. — P. 1348—1359.

28. Nonaka D. A Study of $\Delta Np63$ Expression in Lung Non-Small Cell Carcinomas // *Am. J. Surg. Pathol.* — 24.02.2012 [Epub ahead of print].

29. Rivera M. P., Mehta A. C. Initial diagnosis of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition) // *Chest.* — 2007. — Vol. 132 (suppl. 3). — P.131S—148S.

30. Полежаев Д. А., Раскин Г. А., Феденко А. А. Рекомендации по диагностике рака легкого. — М., 2011. — 30 с.

31. Suitability of thoracic cytology for new therapeutic paradigms in non-small cell lung carcinoma: high accuracy of tumor subtyping and feasibility of EGFR and KRAS molecular testing / Rekhman N., Brandt S. M., Sigel C. S., Friedlander M. A., Riely G. J., Travis W. D., Zakowski M. F., Moreira A. L. // *J. Thorac. Oncol.* — 2011. — Vol. 6, N 3. — P. 451—458.

32. Subtyping of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): comparison of cytology and small biopsy specimens / Sigel C. S., Friedlander M. A., Zakowski M. F., Thornton R. H., Riely G. J., Rekhman N. // *J. Thorac. Oncol.* — 2011. — Vol. 6. — P. 1849—1856.

33. Detection and comparison of epidermal growth factor receptor mutations in cells and fluid of malignant pleural effusion in non-small cell lung cancer / Zhang X., Zhao Y., Wang M., Yap W. S., Chang A. Y. // *J. Lung Cancer.* — 2008. — Vol. 60. — P. 175—182.

34. Morphologic features of adenocarcinoma of the lung predictive of response to the epidermal growth factor receptor kinase inhibitors erlotinib and gefitinib / Zakowski M. F., Hussain S., Pao W., Ladanyi M.,

Ginsberg M. S., Heelan R., Miller V. A., Rusch V. W., Kris M. G. // *Arch. Pathol. Lab. Med.* — 2009. — Vol. 133. — P. 470—477.

35. Frequent EGFR mutations in malignant pleural effusion of lung adenocarcinoma / Wu S. G., Gow C. H., Yu C. J., Chang Y. L., Yang C. H., Hsu Y. C., Shih J. Y., Lee Y. C., Yang P. C. // *Eur. Respir. J.* — 2008. — Vol. 32. — P. 924—930.

36. Evaluation of napsin A, cytokeratin 5/6, p63, and thyroid transcription factor 1 in adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma of the lung / Whithaus K., Fukuoka J., Prihoda T. J., Jagirdar J. // *Arch. Pathol. Lab. Med.* — 2012. — Vol. 136, N 2. — P. 155—162.

37. Advances in Fine Needle Aspiration Cytology for the Diagnosis of Pulmonary Carcinoma / Hasanovic A., Rekhman N., Sigel C. S., Moreira A. L. // *SAGE-Hindawi Access to Research — Pathology Research International.* — 2011. — Art. ID 897292.

Поступила 15.02.2012

*Alentina Ivanovna Pavlovskaya¹, Tatiana Tikhonovna Kondratieva²,
Nadezhda Pavlovna Velizheva³, Semion Venediktovich Petrov⁴,
Nadezhda Vasilievna Balatenko⁵, Somasundaram Subramanian⁶*

CURRENT PRINCIPLES OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER PATHOLOGY DIAGNOSIS ON SMALL BIOPSY AND CYTOLOGICAL SAMPLES

¹ MD, PhD, Leading Researcher, Human Tumor Pathology Anatomy Department, Clinical Oncology Research Institute, FSBI N. N. Blokhin RCRC RAMS (24, Kashirskoe sh., Moscow, 115478, RF)

² MD, PhD, DSc, Leading Researcher, Clinical Cytology Laboratory, Clinical Oncology Research Institute, FSBI N. N. Blokhin RCRC RAMS (24, Kashirskoe sh., Moscow, 115478, RF)

³ MD, PhD, Laboratory of Cell Immunity, Research Institute of Experimental Diagnostics and Tumor Therapy, FSBI N. N. Blokhin RCRC RAMS (24, Kashirskoe sh., Moscow, 115478, RF)

⁴ MD, PhD, DSc, Professor, Head, Molecular Pathology Unit, Tatarstan Republic Clinical Cancer Dispensary, (29, Sibirskiy Trakt st., Kazan, 420029, RF)

⁵ MD, Head, Pathology Anatomy Department, Tatarstan Republic Clinical Cancer Dispensary, (29, Sibirskiy Trakt st., Kazan, 420029, RF)

⁶ MD, Director, Eurasian Federation of Oncology; Senior Researcher, Department of Tumor Biotherapy, Clinical Oncology Research Institute, FSBI N. N. Blokhin RCRC RAMS (24, Kashirskoe sh., Moscow, 115478, RF)

Address for correspondence: Velizheva Nadezhda Pavlovna, Laboratory of Cell Immunity, Research Institute of Experimental Diagnostics and Tumor Therapy, FSBI N. N. Blokhin RCRC RAMS, 24, Kashirskoe sh., Moscow, 115478, RF; e-mail: nadezhda.velizheva@gmail.com

Non-small cell lung carcinomas pathology diagnostics with histologic types and variants clarification allow forming the most adequate treatment strategy of patients. In this paper we perform a justification of necessity in subtyping of non-small cell lung carcinoma as well as diagnostic algorithm on small biopsies and cytological specimens using immunohistochemical panel in difficult cases. The aim is to achieve the exact morphological diagnosis.

Key words: lung cancer, diagnostic algorithm, TTF-1 / p63, adenocarcinoma, squamous cell carcinoma.

Нино Тамазовна Талахадзе¹, Стефано Зуррига²,
Игорь Константинович Воротников³, Нино Валерьяновна Чхиквадзе⁴,
Михаил Иванович Нечушкин⁵, Александр Валерьевич Петровский⁶,
Паоло Арноне⁷, Джэрмана Лиссигини⁸, Джузеппе Виале⁹, Умберто Веронези¹⁰

КЛАССИФИКАЦИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПО СИСТЕМЕ TNM: НЕОБХОДИМОСТЬ ПЕРЕМЕН

¹ К. м. н., врач, отделение опухолей молочной железы,

Европейский институт онкологии (Via Ripamonti, 435, 20141, Милан, Италия)

² Д. м. н., профессор, руководитель, отделение диагностики и хирургии заболеваний молочной железы,

Европейский институт онкологии (Via Ripamonti, 435, 20141, Милан, Италия)

³ Д. м. н., профессор, заведующий, отделение опухолей молочной железы НИИ клинической онкологии

ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁴ К. м. н., врач, отделение опухолей молочной железы НИИ клинической онкологии

ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁵ Д. м. н., профессор, заведующий, отделение радиохимики НИИ клинической онкологии

ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁶ К. м. н., научный сотрудник, отделение радиохимики НИИ клинической онкологии

ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁷ Старший ассистент, отделение опухолей молочной железы,

Европейский институт онкологии (Via Ripamonti, 435, 20141, Милан, Италия)

⁸ Ассистент, отделение опухолей молочной железы,

Европейский институт онкологии (Via Ripamonti, 435, 20141, Милан, Италия)

⁹ Д. м. н., профессор, руководитель, отделение патологической анатомии,

Европейский институт онкологии (Via Ripamonti, 435, 20141, Милан, Италия)

¹⁰ Д. м. н., профессор, научный директор, Европейский институт онкологии

(Via Ripamonti, 435, 20141, Милан, Италия)

Адрес для переписки: Виа Рипамонти, 435, 20141, Милан, Италия,

Европейский институт онкологии, Нино Тамазовна Талахадзе;

e-mail: nina.talakhadze@ieo.it

Описаны предложенные изменения к классификации рака молочной железы TNM, при которой сохраняется структура прежней классификации, но вводятся новые параметры для более точной оценки особенностей опухоли. Данный вариант классификации предполагает также более простое введение дополнительных характеристик, появляющихся в результате открытий. Авторы предлагают заменить критерий Т с указанием конкретного размера опухоли (новообразование диаметром 1,7 см будет описываться символом pT1,7); при этом критерий N должен указывать конкретное число пораженных лимфатических узлов из общего числа удаленных (например, pN5/21). К критерию M предлагается добавить суффиксы, указывающие конкретный пораженный орган. Целесообразным представляется удаление из классификации рака *in situ* (поскольку такие опухоли не могут метастазировать), а также терминов «инфильтрирующий» и «инвазивный», поскольку они не несут дополнительной смысловой нагрузки. Не менее важным представляется включение рецепторного статуса опухоли, уровня экспрессии HER-2/neu и других прогностически значимых маркеров, поскольку именно они определяют тактику лечения и перспективу течения заболевания. Таким образом, данные предложения ведут к смещению акцента с «количества» опухоли на качественные особенности рака молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, классификация TNM.

К первой половине XX века назрела необходимость создания единой международной системы классификации стадий злокачественных опухолей, и в 50-х годах Международный противораковый союз (UICC) [1] опубликовал первую классификацию злокачественных опу-

холей по стадиям заболевания. Затем последовали классификация Международной федерации акушерства и гинекологии (FIGO) [2] и классификация Американского объединенного онкологического комитета (AJCC), первое издание которой вышло в свет в 1977 г. [3].

Эти документы, в основе которых лежат клинические и патологоанатомические данные, позволяют определить стадию заболевания, обозначить степень злокачественности опухоли, а также дают представление о прогнозе заболевания и позволяют выбрать необходимое лечение. Классификация по системе TNM Международного противоракового союза (TNM UICC) в качестве основных характеристик заболевания предполагает определение размера опухоли (Т), поражения регионарных лимфатических узлов (N) и наличия отдаленных метастазов (M).

Несмотря на то что с момента выхода первого издания в 1977 г. классификация по системе TNM регулярно обновляется (последнее, 7-е издание опубликовано в декабре 2009 г.), классификация опухолей молочной железы TNM UICC, по нашему мнению, устарела и нуждается в радикальном пересмотре. Необходимо введение новой информации для создания современной и удобной системы классификации опухолей молочной железы.

По итогам работы междисциплинарной группы ученых, которые за последние 10 лет наблюдали более 30 000 пациенток с опухолями молочной железы, разработаны предложения по пересмотру классификации опухолей молочной железы по системе TNM.

Среди прочих причин создания новой системы классификации был язык существующей TNM UICC, часто оказывающий негативное психологическое влияние на пациенток. Такие термины, как «злокачественная опухоль», «карцинома» и «инфильтрирующая», представляются наиболее пугающими для пациенток. Психологические проблемы наблюдаются у 20—40% пациенток, которым ставится диагноз «рак» [4], а эмотивная терминология, применяемая врачами в устных беседах и в документации, вызывает ассоциации с болью, страданиями и смертью, что, скорее всего, только усугубляет имеющиеся проблемы.

Чувство страха и неопределенности, которое вызывает онкологический диагноз, может побудить пациентку как всецело довериться лечащему врачу, задавать вопросы о заболевании, так и спровоцировать поиск информации в интернете. Однако нередки и противоположные реакции [5], когда пациентка замыкается в себе и воспринимает диагноз как смертный приговор. То, как устно и письменно описывается диагноз, может в значительной степени повлиять на реакцию пациентки. Терминология TNM UICC может негативно повлиять на психологическое состояние и помешать пациентке смириться с диагнозом [6].

Услышав диагноз «карцинома in situ», пациентка станет очень волноваться и будет думать, что ее опухоль неизлечима. Представьте реакцию женщины с диагнозом «инфильтрирующая карцинома». Удручающий эффект слова «карцинома» усугубляется к тому же определением «инфильтрирующая». Пациентка считает, что, хотя заболевание и диагностировано на ранней стадии, оно уже «инфильтрировало», т. е. проникло в другие органы, и обязательно убьет ее. В результате у пациентки исче-

зает так необходимая для прохождения лечения надежда на выздоровление; женщина спрашивает, как долго ей осталось жить, и не находит себе места от мысли, что не увидит, как вырастут ее дети.

Однако после беседы с врачом пациентка с карциномой in situ успокаивается, узнав, что у нее протоковая или дольковая карцинома in situ, что этот тип очагов биологически отличается от инфильтрирующих опухолей и что, скорее всего, после лечения наступит полное выздоровление. Дополнительная информация о природе заболевания также положительно скажется на состоянии других пациенток.

Одним из наиболее важных новшеств, предлагаемых в классификации Европейского института онкологии по системе TNM (TNM IEO), является исключение терминов «карцинома in situ» и «инфильтрирующая» (именно они чаще всего неправильно толкуются пациентами) и замена их более логичными и точными терминами [7—9]. Новая терминология также предусматривает четкое разграничение очагов, которые могут метастазировать, и тех, что не могут.

Другое новшество в классификации TNM IEO — более точное определение Т и N, позволяющее достовернее и удобнее устанавливать «стадию заболевания», при этом совместимое с ранними категориями Т и N. Последнее позволит проводить статистические сравнения старых и новых данных.

Предыдущие классификации TNM UICC преследовали важную цель предоставления прогноза заболевания и, следовательно, определения тактики лечения. Протоковая карцинома in situ (ПКИС) и дольковая карцинома (ДКИС) рассматриваются в рамках параметра Т. Однако, как уже отмечалось, эти новообразования не являются инфильтрирующими по определению и не могут распространяться на отдаленные органы. Следовательно, они не должны считаться злокачественными образованиями или карциномами, их необходимо исключить из классификации TNM. Мы предлагаем принять классификацию Тавассоли [10], в которой термины ПКИС и ДКИС опускаются, а вместо них используются термины «внутрипротоковая интраэпителиальная неоплазия» (ВИН) и «дольковая интраэпителиальная неоплазия» (ДИН) (табл. 1), в дальнейшем подразделяемые в соответствии со степенью неоплазии.

Кроме того, поскольку термин «инфильтрирующая» в диагнозе «инфильтрирующая карцинома» является избыточным, так как карцинома инфильтрирующая (или инвазивная) по определению, мы предлагаем исключить термин «инфильтрирующая» из классификации TNM.

РАЗМЕР ОПУХОЛИ (Т)

В классификации TNM UICC злокачественные опухоли в зависимости от размера разделяются на категории (T1, T2 и т. д.), однако без существенной логики. При создании первой классификации TNM 60 лет назад такой подход был обоснован, поскольку тогда могли быть диагностированы только крупные опухоли, которые можно было пальпировать. В настоящее время отсутствие логики в разделении на категории Т очевидно.

Во-первых, категории не используют всю информацию, предоставляемую современными диагностически-

© Талахадзе Н. Т., Зуррида С., Воротников И. К., Чхиквадзе Н. В., Нечушкин М. И., Петровский А. В., Арноне П., Лиссидини Д., Виале Д., Веронези У., 2012
УДК 618.19-006.6.001.33

Таблица 1

Сравнительная характеристика классификации стадий опухолей молочной железы TNM: UICC (7-й пересмотр) и классификация Тавассоли: первичная опухоль (Т)

TNM UICC (7-й пересмотр, 2009)		Классификация Тавассоли
pTis	pTis (ПКИС) — протоковая карцинома in situ	
	ПКИС, стадия 1	Внутрипротоковая интраэпителиальная неоплазия, стадия 1с (ВИН1с)
	ПКИС, стадия 2	Внутрипротоковая интраэпителиальная неоплазия, стадия 2 (ВИН2)
	ПКИС, стадия 3	Внутрипротоковая интраэпителиальная неоплазия, стадия 3 (ВИН3)
	pTis (ДКИС) — дольковая карцинома in situ	
	ДКИС (классическая)	Дольковая интраэпителиальная неоплазия, стадия 2 (ДИН2)
	ДКИС (тяжелая плеоморфная)	Дольковая интраэпителиальная неоплазия, стадия 3 (ДИН3)

ми методами, которые позволяют определить даже очень небольшие опухоли. А это значит, что в категорию T1 попадают опухоли размером от нескольких миллиметров до 2 см, и разница в прогнозе при этом соответствующая. Эта разница частично покрывается подкатегориями T1 (T1a, 1—5 мм; T1b, 6—10 мм; T1c, 11—20 мм). Они, однако, по сути своей спорны и чрезмерно сложны.

Еще более заметна разница в прогнозе в рамках категории T2, куда входят опухоли размером от 2,1 до 5 см. Эта разница ярко демонстрирует спорность категорий T, которая в первую очередь рассматривает диаметр, а не объем опухолей. Таким образом, опухоль диаметром 2,1 см будет иметь объем 4,5 мл (при условии, что это шарообразная опухоль), а при диаметре 5 см объем опухоли составит около 60 мл. Разница в прогнозах для двух опухолей значительна.

Исходя из изложенного мы предлагаем отказаться от категорий T классификации TNM UICC и заменить их более точным описанием размера опухолей в сантиметрах (табл. 2). В результате получится более интуитивно понятная и информативно насыщенная классификация.

РЕГИОНАРНЫЕ ЛИМФАТИЧЕСКИЕ УЗЛЫ (N)

Классификация поражения регионарных лимфатических узлов по TNM IEO следует логике новой классификации категорий T: указывается точное число пораженных лимфатических узлов из всех рассмотренных и удаленных. Например, pN(5/21) означает, что из 21 рассмотренного лимфатического узла 5 оказались поражены метастазами. Удобным представляется следующее

обозначение: если, например, из 28 рассмотренных подмышечных лимфатических узлов 3 поражены метастазами, то по классификации TNM UICC N состояние будет обозначаться как N1b, а в классификации TNM IEO — pN + (3/28).

За последние 10 лет биопсия сигнальных лимфатических узлов кардинально изменила хирургический подход к вмешательствам на подмышечных лимфатических узлах [11]. Эти изменения нашли отражение в классификации TNM UICC, в классификации TNM IEO предлагается лишь добавлять индекс (sn) (табл. 3). При экстракапсулярной инвазии добавляется индекс ExCp.

При биопсии сигнального узла с интраоперационным обследованием серийных срезов в 50 мкм [12] часто обнаруживают микрометастазы (< 2 мм) или даже мелкие кластеры раковых клеток (изолированные опухолевые клетки). В связи с этим в классификацию TNM UICC были внесены изменения — добавлены категории Nmic и Nitc, применявшиеся, например, в исследовании 23/01 [13].

ОТДАЛЕННЫЕ МЕТАСТАЗЫ (M)

При наличии отдаленных метастазов в классификации TNM UICC применяется категория M1. Мы предлагаем уточнять место распространения метастазов, поскольку применение новых методов лечения, таких, как радиочастотная термоабляция [14], стереотаксическая радиохirurgия (гамма-нож) [15], терапия высокоинтенсивным фокусированным ультразвуком [16] и моноклональными антителами [17; 18], позволяют обсуждать вопрос о разных шансах на успех в лечении различных мест распространения метастазов. Для описания этих мест мы предлагаем использовать индексы. В табл. 4 представлены индексы M в классификации TNM IEO по сравнению с последней версией TNM UICC.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

С развитием знаний о молекулярной и генетической природе рака молочной железы (РМЖ) ученым стали известны новые биологические характеристики, используемые в качестве прогностических признаков, и были разработаны новые методы адьювантного лечения. В результате подход к лечению больных РМЖ стал более индивидуальным — в каждом случае принимаются во внимание биологические характеристики конкретной пациентки.

Примеры таких характеристик: экспрессия рецепторов эстрогенов (ER) и прогестерона (PR); экспрессия маркера пролиферации Ki-67 [19] в активной фазе клеточного цикла (G1, S, G2 и митоза) и ее отсутствие в покоящихся клетках (G0) [20]; в последнее время выделяют также экспрессию рецептора 2-го типа эпидермального фактора роста человека (HER-2).

Выявление экспрессии HER-2 (известного также как пеп, или erbB2) встречается в 20—30% случаев РМЖ. Обычно это происходит в результате амплификации гена в раковых клетках. Избыточная экспрессия HER-2 указывает на агрессивный тип злокачественного новообразования. Моноклональное антитело трастузумаб способно блокировать HER-2 и улучшать прогноз у больных с этим видом РМЖ.

Таблица 2

Сравнительная характеристика классификации TNM стадий опухолей молочной железы: UICC (7-й пересмотр) и TNM IEO: первичная опухоль (Т)

TNM UICC (7-й пересмотр, 2009)		TNM IEO
Tx	Первичную опухоль невозможно оценить	То же
pT0	Первичной опухоли нет	То же
pTis	pTis — карцинома in situ pTis (ПКИС) — протоковая карцинома in situ pTis (ДКИС) — дольковая карцинома in situ pTis (болезнь Педжета) — болезнь Педжета соска без определяемой опухоли	Исключается (см. табл. 1. Классификация Тавассоли)
pT1	Опухоль 2 см или менее в наибольшем измерении	См. ниже
pT1mic	Микрометастазы менее 0,1 см в наибольшем измерении ^a	pTmic
pT1a	Опухоль более 0,1 см, но не более 0,5 см в наибольшем измерении	Т и размер в сантиметрах. Добавляются следующие индексы: m — многоочаговая (мультицентрическая) опухоль; eis — наличие распространенной ВИН ($\geq 25\%$ опухоли); pvi — перитуморальная сосудистая инвазия; infl — лимфангитная или воспалительная карцинома. Пример: pT 1,9 (m)
pT1b	Опухоль более 0,5 см, но не более 1,0 см в наибольшем измерении	
pT1c	Опухоль более 1,0 см, но не более 2,0 см в наибольшем измерении	
pT2	Опухоль более 2,0 см, но не более 5,0 см в наибольшем измерении	
pT3	Опухоль более 5,0 см в наибольшем измерении	
pT4	Опухоль любых размеров с прямым распространением на следующие структуры	
T4a	Грудную клетку (грудная клетка, в том числе ребра, межреберные мышцы и передняя зубчатая, но не большая или малая грудные мышцы)	
T4b	С отеком (в том числе «лимонная корка»), изъязвлением кожи молочной железы или дочерними узелками (сателлитами) на коже той же железы	
T4c	Сочетание вариантов T4a и T4b	
T4d	Воспалительная карцинома ^b	

^a T1 Mic определяется как инфильтрация менее 0,1 см в наибольшем измерении (микрометастаз). В скобках стоит отмечать наличие множественных очагов инфильтрации. Микрометастаз — распространение неопластических клеток за пределы базальной мембраны соседних тканей, при этом максимальный диаметр очагов не превышает 0,1 см. При наличии нескольких таких очагов во внимание принимается крупнейший по размеру очаг, а не сумма диаметров нескольких очагов. Необходимо отмечать наличие нескольких очагов, как и в случае с множественными карциномами более крупных размеров.

^b Воспалительная карцинома — клинико-патологическая единица, характеризующаяся диффузной бурой индурацией кожи с эризипеллоидным краем, обычно без подлежащей массы. Если биопсия кожи указывает на отсутствие вовлеченности в процесс и нет локализованного, с определяемыми размерами первичного рака, категория Т есть pTx при патогистологическом определении стадии воспалительной карциномы (T4d). Кожа, покрытая ямочками, втяжение соска или другие изменения кожи, за исключением тех, что бывают при T4b и T4d, могут оцениваться как T1, T2 или T3, не влияя при этом на классификацию. Это клиническая картина вызвана эмболией лимфатических капилляров с застоем в поверхностных капиллярах.

По некоторым данным, способ измерения экспрессии HER-2 в ткани опухоли влияет на показания к назначению трастузумаба [21]. Основным методом определения экспрессии HER-2 является результат ИГХИ, который оценивается по балльной шкале от 0 до +3 в зависимости от выраженности и объема мембранного окрашивания клеток опухоли [22; 23]. При нечетком результате ИГХИ

применяют флуоресцентную гибридизацию in situ (FISH) для определения амплификации гена *HER-2* в клетке опухоли. Ген расположен на длинном плече 17-й хромосомы [17q21—q22] [24], амплификация HER-2 определяется относительно этой хромосомы. К сожалению, несмотря на усилия по созданию стандартизированного и надежного метода измерения HER-2, результаты исследований

Таблица 3

Сравнительная характеристика классификации TNM стадий опухолей молочной железы: UICC (7-й пересмотр) и TNM IEO: регионарные лимфатические узлы (N)

TNM UICC (7-й пересмотр, 2009) ^{a,6}		TNM IEO ^a
pNx	Регионарные лимфатические узлы невозможно оценить (например, если они не были удалены для патогистологического исследования или были удалены ранее)	То же
pN0	Регионарные лимфатические узлы не поражены метастазами при гистологическом исследовании и при отсутствии дополнительного исследования на наличие изолированных опухолевых клеток (ITC) ⁶	<p>pN (x/y), где x — число патологических лимфатических узлов; y — число исследованных лимфатических узлов. Добавляются следующие индексы: sn — сигнальный лимфатический узел; exр — экстракапсулярная инвазия; bln — «гроздь» лимфатических узлов; ITCs — изолированные опухолевые клетки. Примеры: pN(4/28)exр; pN (0/2)(sn-ITCs)</p>
pN0(i-)	Отсутствие метастазов в регионарных лимфатических узлах при гистологическом и иммуногистохимическом исследовании (ИГХИ)	
pN0(i+)	Отсутствие метастазов в регионарных лимфатических узлах при гистологическом исследовании, при ИГХИ размер кластера не превышает 0,2 мм ⁶	
pN0(mol-)	Отсутствие метастазов в регионарных лимфатических узлах при гистологическом и молекулярном (ПЦР-ОТ) исследовании	
pN0(mol+)	Отсутствие метастазов в регионарных лимфатических узлах при гистологическом исследовании, положительный результат при молекулярном исследовании (ПЦР-ОТ)	
pN1	Метастазы в 1—3 подмышечных лимфатических узлах и/или внутригрудных лимфатических узлах с микроскопическим поражением, выявленным при исследовании сигнального лимфатического узла, но не определяемым клинически ⁷	
pN1mii	Микрометастазы (размерами более 0,2 мм, но не более 2,0 мм)	
pN1a	Метастазы в 1—3 подмышечных лимфатических узлах	
pN1b	Метастазы во внутригрудных лимфатических узлах, выявленные при исследовании сигнального лимфатического узла, но не определяемые клинически ⁷	
pN1c	Метастазы в 1—3 подмышечных и внутригрудных лимфатических узлах с микроскопическим поражением, выявленным при исследовании сигнального лимфатического узла, но не определяемые клинически ^{7,8}	
pN2	Метастазы в 4—9 подмышечных лимфатических узлах или клинически выявляемое ⁹ поражение внутригрудных лимфатических узлов в отсутствие метастазов в подмышечных лимфатических узлах	
pN2a	Метастазы в 4—9 подмышечных лимфатических узлах (при размере как минимум одного кластера более 2,0 мм)	
pN2b	Клинически выявляемое ⁹ поражение внутригрудных лимфатических узлов в отсутствие метастазов в подмышечных лимфатических узлах	
pN3	Метастазы в 10 подмышечных лимфатических узлах и более, или в подключичных лимфатических узлах, или в клинически выявляемых ⁹ ипсилатеральных внутригрудных лимфатических узлах при наличии одного или более пораженных метастазами подмышечных лимфатических узлов, или при наличии более 3 пораженных метастазами подмышечных лимфатических узлов при условии микроскопического метастатического поражения во внутригрудных лимфатических узлах или в ипсилатеральных надключичных лимфатических узлах	

Таблица 3 (Окончание)

TNM UICC (7-й пересмотр, 2009) ^{a,б}		TNM IEO ^a
pN3a	Метастазы в 10 подмышечных лимфатических узлах и более (при размере как минимум одного кластера более 2,0 мм) или метастазы в подключичных лимфатических узлах	
pN3b	Метастазы в клинически выявляемых ^в ипсилатеральных внутригрудных лимфатических узлах при наличии одного или более пораженных метастазами подмышечных лимфатических узлов; или при наличии более 3 пораженных метастазами подмышечных лимфатических узлов при условии микроскопического метастатического поражения (выявленного при исследовании сигнального лимфатического узла) во внутригрудных лимфатических узлах, не определяемых клинически ^г	
pN3c	Метастазы в ипсилатеральных надключичных лимфатических узлах	

ПЦР-ОТ — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

^a Регионарные лимфатические узлы: (1) подмышечные (ипсилатеральные): межпекторальные (узлы Роттера) и лимфатические узлы вдоль подмышечной вены и ее притоков, эти узлы в свою очередь делятся на три уровня: уровень 1 (нижняя часть подмышечной ямки): лимфатические узлы, расположенные латерально по отношению к латеральной границе малой грудной мышцы; уровень 2 (средняя часть подмышечной ямки): лимфатические узлы, расположенные между медиальной и латеральной границами малой грудной мышцы и межгрудные лимфатические узлы (Роттера); уровень 3 (верхушечная часть подмышечной ямки): лимфатические узлы, расположенные медиально по отношению к медиальной границе малой грудной мышцы, в т. ч. и узлы, известные как подключичные и апикальные. Примечание: внутригрудные лимфатические узлы считаются подмышечными. (2) ипсилатеральные подключичные; (3) внутригрудные (ипсилатеральные): лимфатические узлы в межреберных областях по краю грудины в эндоторакальной фасции; (4) надключичные (ипсилатеральные).

^б Классификация основана на удалении подмышечных лимфатических узлов с биопсией сигнального узла или без таковой. Классификация, основанная исключительно на биопсии сигнального лимфатического узла без последующего удаления подмышечных узлов, рассчитана для (sn) «сигнального лимфатического узла», например, pN0 (i+)(sn).

^в Случаи с наличием только изолированных опухолевых клеток (ИТС) в регионарных лимфатических узлах классифицируются как pN0. Изолированные опухолевые клетки представляют собой единичную опухолевую клетку или кластер клеток размерами не более 0,2 мм, выявляемый только на основании ИГХИ или молекулярных методов, которые можно проверить методом окрашивания гематоксилином и эозином. ИТС не обнаруживает признаков злокачественности, т. е. пролиферации или стромальной реакции.

^г Клинически не выявляемое поражение означает не диагностируемое с помощью осмотра или инструментальных методов исследования (за исключением лимфосцинтиграфии).

^а При метастатическом поражении более трех подмышечных лимфатических узлов, для отражения прогрессирования заболевания, поражение внутригрудных лимфатических узлов классифицируется как pN3b.

^б Клинически выявляемое поражение — диагностируемое с помощью осмотра или инструментальных методов исследования (за исключением лимфосцинтиграфии).

могут быть неточными, что затрудняет назначение трастузумаба.

Мы предлагаем использовать параметр HER-2 в классификации TNM IEO, указывая при этом не только результат ИГХИ (при котором определяется процент опухолевых клеток с ярко выраженным окрашиванием), но и данные флуоресцентной гибридизации *in situ*, если таковая проводилась, отмечая при этом амплификацию/ее отсутствие/полисомию 17-й хромосомы. Абсолютное и относительное количество копий гена *HER-2* также будет указываться.

Важную роль в распространении опухоли играют и раковые стволовые клетки. Согласно теории раковых стволовых клеток, их малое количество содержится в большинстве опухолей. Эти клетки растут относительно медленно, а путем асимметричного деления производят самоподдерживающиеся клетки, в основном быстро делящиеся клетки, формирующие опухоль. И хотя клетки последнего типа являются более дифференцированными, они не обладают метастатическим потенциалом. Согласно этой точке зрения клетки в опухоли организованы в иерархическом порядке, как и в обычной ткани, а образование опухоли считается органогенезом, происходящим по другому сценарию. Количество стволовых кле-

ток и их свойства в большинстве случаев различаются в зависимости от опухоли, в результате чего различается и динамика распространения. К примеру, было выдвинуто предположение о том, что в «базальноподобной» опухоли молочной железы содержится повышенное количество раковых стволовых клеток [25; 26].

Опухоль с высоким содержанием раковых стволовых клеток имеет больший метастатический потенциал, поскольку клетки, распространяющиеся от первичной опухоли, скорее всего, являются стволовыми.

Из перечисленного следует, что размер опухоли является весьма грубым параметром, в то время как усовершенствованное определение молекулярных характеристик опухоли, вероятнее всего, дает более точный прогноз развития заболевания.

Таким образом, мы предлагаем ввести в классификацию категории T новые прогностически значимые индексы: EIC (распространенный внутрипротоковый компонент), PVI (перитуморальная сосудистая инвазия), M (многоочаговость) и INF (воспалительная опухоль). Эта информация будет ясна и для пациента, и для врача (например, pT1.5EIC; pT0.7PVI).

Мы считаем, что удобная классификация TNM должна быть достаточно гибкой, чтобы принимать новую ин-

Таблица 4

Сравнительная характеристика классификации TNM стадий опухолей молочной железы: UICC (7-й пересмотр) и TNM IEO: отдаленные метастазы (M)

TNM UICC (7-й пересмотр, 2009)		TNM IEO	
pMx	Недостаточно данных для оценки отдаленных метастазов	То же	
pM0	Отдаленные метастазы отсутствуют	То же	
pM1	Отдаленные метастазы (место распространения можно уточнить)	pM1 PUL	Легкие
		pM1 OSS	Кости
		pM1 HEP	Печень
		pM1 BRA	Мозг
		pM1 LYM	Экстрарегионарные лимфатические узлы
		pM1 PLE	Плевра
		pM1 PER	Брюшная полость
		pM1 ADR	Надпочечники
		pM1 SKI	Кожа
		pM1 OTH	Прочие органы
pM1 susp	Подозрение на метастазы (требуется подтверждение)		

формацию о прогностических факторах при РМЖ, в том числе данные об экспрессии генов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Denoix P. F., Schwartz D. General rules for classification of cancers and presentation of the therapeutic results // *Mem. Acad. Chir.* — 1959. — Vol. 85, N 15—16. — P. 415—424.
2. History of the FIGO cancer staging system / Odicino F., Pecorelli S., Zigliani L., Creasman W. T. // *Int. J. Gynaecol. Obstet.* — 2008. — Vol. 101, N 2. — P. 205—210.

3. AJCC cancer staging manual. — 6th ed. / Edge S. B., Byrd D. R., Compton C. C., Fritz A. G., Greene F. L., Trotti A. — New York: Springer, 2010. — 646 p.

4. The prevalence of psychiatric disorders among cancer patients / Derogatis L. R., Morrow G. R., Fetting J., Penman D., Pisetsky S., Schmale A. M., Henrichs M., Carnicke C. L. // *JAMA.* — 1983. — Vol. 249, N 6. — P. 751—757.

5. Cancer Patients' information needs and information seeking behaviour: in depth interview study / Leydon G. M., Boulton M., Moynihan C., Alison J., Mossman J., Markella B., McPherson K. // *Br. Med. J.* — 2000. — Vol. 320. — P. 909—913.

6. Costelloe M., Nelson L. The needs of recently diagnosed cancer patients // *Nurs. Stand.* — 2004. — Vol. 19, N 13. — P. 42—44.

7. Rethinking TNM: breast cancer TNM classification for treatment decisionmaking and research / Veronesi U., Viale G., Rotmensz N., Goldhirsch A. // *Breast.* — 2006. — Vol. 15, N 1. — P. 3—8.

8. Rethinking TNM: a breast cancer classification to guide to treatment and facilitate research / Veronesi U., Zurrada S., Viale G., Galimberti V., Arnone P., Nole F. // *Breast.* — 2009. — Vol. 3. — P. 291—295.

9. Breast cancer classification: time for a change / Veronesi U., Zurrada S., Goldhirsch A., Rotmensz N., Viale G. // *J. Clin. Oncol.* — 2009. — Vol. 27, N 15. — P. 2427—2428.

10. Tavassoli F. A. Ductal carcinoma in situ: introduction of the concept of ductal intraepithelial neoplasia // *Mod. Pathol.* — 1998. — Vol. 11. — P. 140—154.

11. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer / Veronesi U., Paganelli G., Viale G., Luini A., Zurrada S., Galimberti V., Intra M., Veronesi P., Robertson C., Maisonneuve P., Renne G., De Cicco C., De Lucia F., Gennari R. // *N. Engl. J. Med.* — 2003. — Vol. 349. — P. 546—553.

12. Extensive frozen section examination of axillary sentinel nodes to determine selective axillary dissection / Veronesi U., Zurrada S., Mazzarol G., Viale G. // *World J. Surg.* — 2000. — Vol. 25, N 6. — P. 806—808.

13. Galimberti V. International breast cancer study group trial of sentinel node biopsy // *J. Clin. Oncol.* — 2006. — Vol. 24, N 1. — P. 210—211.

14. Fernando H. C. Radiofrequency ablation to treat non-small cell lung cancer and pulmonary metastases // *Ann. Thorac. Surg.* — 2008. — Vol. 85. — P. 780—784.

15. Ranjan T., Abrey L. E. Current management of metastatic brain disease // *Neurotherapeutics.* — 2009. — Vol. 6, N 3. — P. 598—603.

16. Kennedy J. E. High-intensity focused ultrasound in the treatment of solid tumours // *Nat. Rev. Cancer.* — 2005. — Vol. 5, N 4. — P. 321—327.

17. The management of colorectal liver metastases: expanding the role of hepatic resection in the age of multimodal therapy / Chiappa A., Makuuchi M., Lygidakis N. J., Zbar A. P., Chong G., Bertani E., Sitzler P. J., Biffi R., Pace U., Bianchi P. P., Contino G., Misitano P., Orsi F., Travaini L., Trifiro' G., Zampino M. G., Fazio N., Goldhirsch A., Andreoni B. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* — 2009. — Vol. 72, N 1. — P. 65—75.

18. Paganelli G., Chinol M. Radioimmunotherapy: is avidinbiotin pretargeting the preferred choice among pretargeting methods // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* — 2003. — Vol. 30, N 5. — P. 773—776.

19. Cell kinetics as a predictive factor in node-positive breast cancer treated with adjuvant hormone therapy / Silvestrini R., Daidone M. G., Mastore M., Di Fronzo G., Coradini D., Boracchi P., Squicciarini P., Salvadori B., Veronesi U. // *J. Clin. Oncol.* — 2003. — Vol. 6. — P. 1150—1155.

20. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer / Goldhirsch A., Wood W. C., Gelber R. D., Coates A. S., Thurlimann B., Senn H. J. // *Ann. Oncol.* — 2007. — Vol. 18, N 7. — P. 1133—1144.

21. Clinical Relevance of HER-2 Overexpression/amplification in patients with small tumor size and node-negative breastcancer / Curigliano G., Viale G., Bagnardi P. V., Fumagalli L., Locatelli M., Rotmensz N., Ghisini R., Zurrada S., Veronesi P., Goldhirsch A. // *J. Clin. Oncol.* — 2009. — Vol. 27. — P. 5693—5699.

22. Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system / Jacobs T. W., Gown A. M., Yaziji H., Barnes M. J., Schnitt S. J. // *J. Clin. Oncol.* — 1999. — Vol. 17. — P. 1983—1987.

23. HER-2 fluorescence in situ hybridization: Results from the survey program of the College of American Pathologists / Persons D. L.,

Tubbs R. R., Cooley L. D., Dewald G. W., Dowling P. K., Du E., Mascarello J. T., Rao K. W., Wilson K. S., Wolff D. J., Habegger-Vance G. // Arch. Pathol. Lab. Med. — 2006. — Vol. 130. — P. 325—331.

24. Correction for chromosome 17 is critical for determination of true Her-2/neu gene amplification status in breast cancer / Dal Lago L., Durbecq V., Desmedt C., Salgado R., Verjat T., Lespagnard L., Ma Y., Veys I., Di Leo A., Sotiriou C., Piccart M., Larsimont D. // Mol. Cancer Ther. — 2006. — Vol. 5. — P 572—579.

25. Molecular portraits of human breast tumours / Perou C. M., Sørlie T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S. S., Rees C. A., Pollack J. R., Ross D. T., Johnsen H., Akslen L. A., Fluge O. R., Pergamenschikov A.,

Williams C., Zhu S. X., Lønning P. E., Børresen-Dale A. L., Brown P. O., Botstein D. // Nature. — 2000. — Vol. 406. — P. 747—752.

26. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumour subclasses with clinical implications / Sørlie T., Perou C. M., Tibshirani R., Aas T., Geisler S., Johnsen H., Hastie T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S. S., Thorsen T., Quist H., Matese J. C., Brown P. O., Botstein D., Eystein Lønning P., Børresen-Dale A. L. // Proc. Natl. Acad. Sci. — 2001. — Vol. 98. — P. 10 869—10 874.

Поступила 11.09.2011

*Nino Tamazovna Talakhadze¹, Stefano Zurrada², Igor Konstantinovich Vorotnikov³,
Nino Valerianovna Chkhikvadze⁴, Mikhail Ivanovich Nechushkin⁵,
Alexander Valerievich Petrovsky⁶, Paolo Arnone⁷, Germana Lissidini⁸,
Giuseppe Viale⁹, Umberto Veronesi¹⁰*

TNM CLASSIFICATION OF BREAST CANCER: TIME FOR A CHANGE

¹ MD, PhD, Physician, Breast Tumor Department, European Institute of Oncology (Via Ripamonti, 435, 20141, Milan, Italy)

² MD, PhD, Professor, Head, Breast Tumor Diagnosis and Surgery,
European Institute of Oncology (Via Ripamonti, 435, 20141, Milan, Italy)

³ MD, PhD, Professor, Head, Breast Tumor Department, Clinical Oncology Research Institute,
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁴ MD, PhD, Physician, Breast Tumor Department, Clinical Oncology Research Institute,
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁵ MD, PhD, DSc, Professor, Head, Radiosurgery Department, Clinical Oncology Research Institute,
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁶ MD, PhD, Researcher, Radiosurgery Department, Clinical Oncology Research Institute,
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁷ Senior Assistant, Breast Tumor Department, European Institute of Oncology (Via Ripamonti, 435, 20141, Milan, Italy)

⁸ Assistant, Breast Tumor Department, European Institute of Oncology (Via Ripamonti, 435, 20141, Milan, Italy)

⁹ MD, PhD, Professor, Head, Pathology Department, European Institute of Oncology (Via Ripamonti, 435, 20141, Milan, Italy)

¹⁰ MD, PhD, Professor, Scientific Director, European Institute of Oncology (Via Ripamonti, 435, 20141, Milan, Italy)

Address for correspondence: Talakhadze Nina Tamazovna, European Institute of Oncology,
Via Ripamonti, 435, 20141, Milan, Italy; e-mail: nina.talakhadze@ieo.it

Changes are proposed to TNM classification of breast cancer which preserve structure of the existing classification while introducing new parameters for a more accurate specification of tumors. This classification version also involves a simpler addition of other characteristics as resulting from new discoveries. The authors propose that indication of specific tumor size should be added to the T parameter (a tumor 1.7 cm in diameter will be described as pT1.7); the N criterion should also indicate the number of positive nodes with respect to the total number of those removed (e. g. pN5/21). The M criterion should be supplemented with suffixes indicating the involved site. It seems reasonable to remove *in situ* cancer from the system because such tumors do not metastasize, as well as terms 'infiltrating' and 'invasive', since they do not carry additional meaningful information. It also seems important to introduce tumor receptor status, level of expression of HER-2neu and other prognostically important markers since they influence choice of treatment strategy and are predictors of disease course. Our proposals therefore lead to a shift from assessment of tumor 'burden' to specific characteristics of breast cancer.

Key words: breast cancer, TNM classification.

ЮБИЛЕИ

Член-корреспондент РАМН, профессор **Б. И. ДОЛГУШИН** (к 60-летию со дня рождения)



15 февраля 2012 г. исполнилось 60 лет Борису Ивановичу Долгушину, заместителю директора по научной работе НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН, доктору медицинских наук, профессору, члену-корреспонденту РАМН, лауреату премии Правительства РФ в области науки и техники.

Борис Иванович Долгушин родился в Тамбове в семье врачей. Отец и мать Бориса Ивановича — медики в первом поколении, ставшие основателями самой многочисленной на Тамбовщине врачебной династии, включающей 13 врачей, в том числе трех заслуженных врачей РФ.

После окончания в 1975 г. лечебного факультета 2-го Московского ордена Ленина Государственного медицинского института им. Н. И. Пирогова Борис Иванович Долгушин обучался в клинической ординатуре, а затем в аспирантуре Онкологического научного центра АМН СССР. В 1980 г. он защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук «Ангиографическая диагностика вторичных опухолей в печени», а в 1989 г. — диссертацию на соискание ученой степени доктора медицинских наук «Абдоминальная ангиография в комплексной диагностике опухолей у детей».

Вся последующая трудовая деятельность Бориса Ивановича Долгушина неразрывно связана с РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, где он прошел путь от первых шагов в профессии до вершин профессионального мастерства, от начинающего врача до признанного лидера в вопросах лучевой диагностики и интервенционно-радиологических методов лечения, от младшего научного сотрудника до руководителя крупнейшего в Европе специализированного многопрофильного отдела, в котором представлены все современные направления лучевой диагностики и интервенционной радиологии:

рентгеновское, ультразвуковое, радионуклидное, рентгенохирургическое, рентгеноэндоскопическое. Благодаря организаторским способностям, профессиональному таланту и новаторскому подходу к решению возложенных на него задач Б. И. Долгушин успешно осуществил реорганизацию структурных подразделений центра, обеспечивавших лучевую визуализацию в онкологии, объединив их в единую службу, осуществил ее техническое перевооружение, подготовил специалистов-практиков и научных работников высокой квалификации, способных решать самые сложные задачи диагности-

ки и малоинвазивного лечения в онкологии, развивать современную медицинскую науку. Первым в стране Б. И. Долгушин еще в 1998 г. полностью перевел огромный отдел лучевой диагностики на беспленочную цифровую технологию, создал первые в стране специализированное отделение рентгенохирургических методов диагностики и лечения и рентгеноэндоскопическое отделение, инициировал создание в РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН центра позитронно-эмиссионной томографии. В настоящее время под руководством Бориса Ивановича трудятся более 350 сотрудников, из них 16 профессоров и докторов наук, более 20 кандидатов наук. Ежедневно в отделе проходят обследование и лечение более 600 онкологических пациентов, которым проводится около 1500 исследований и вмешательств.

Борис Иванович Долгушин — профессор кафедры лучевой диагностики, лучевой терапии и медицинской физики РМАПО, в создании которой он принял активное участие. Под руководством проф. Б. И. Долгушина защищены 7 докторских и 22 кандидатских диссертации. Многие его ученики стали руководителями профильных служб в специализированных медицинских центрах Москвы и других городов России и СНГ. Б. И. Долгушин — автор более 250 научных работ, 11 мо-

нографий, авторских свидетельств и патентов. Он разработал и внедрил целый ряд новаторских интервенционно-радиологических методик лечения опухолей печени и желчных протоков, почек и мочеточников, дыхательной, костной и пищеварительной систем, послеоперационных осложнений торако-абдоминальных вмешательств.

Проф. Б. И. Долгушин — член диссертационного совета и ученого совета НИИ клинической онкологии, объединенного ученого совета РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, член редколлегии журналов «Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН», «Диагностическая и интервенционная радиология», «Медицинская визуализация», «Лучевая диагностика и терапия», «Саркомы костей, мягких тканей и кожи», «Поволжский онкологический вестник», председатель проблемной комиссии «Диагностическая и лечебная интервенционная радиология» Научного совета РАМН и МЗ РФ, председатель секции «Интервенционная онкология» Московского общества рентгенологов, член Российского, Европейского и Североамериканского обществ рентгенологов, Президент национального общества интервенционных онкорадиологов.

Важными вехами в жизни Б. И. Долгушина стали присвоение звания профессор по специальности «онкология» (1997 г.), а также избрание членом-корреспондентом РАМН по специальности «лучевая диагностика» (2007 г.).

Государство и профессиональное сообщество высоко оценило заслуги Бориса Ивановича перед отечественным здравоохранением и медицинской наукой. Он награжден медалью «В память 850-летия Москвы», медалью ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени, является лауреатом премии Правительства РФ в области науки и техники, премии им. Н. Н. Петрова за лучшую научную работу по онкологии.

Однако перечисление достижений проф. Б. И. Долгушина не дает представления о нем как о личности. Борис Иванович — удивительно добрый, теплый, мягкий в общении и отзывчивый человек, коллега и друг. Он вырастил двух сыновей, один из которых идет по отцовским стопам. В дружной семье Бориса Ивановича подрастают внуки.

Друзья, коллеги и ученики от души поздравляют Бориса Ивановича Долгушина с юбилеем, желают ему доброго здоровья, долгих лет жизни, дальнейшей активной и плодотворной деятельности на благо населения страны, отечественного здравоохранения и медицинской науки!

*Коллектив ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН
Редакция журнала «Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН»
Коллеги, ученики и друзья*

ТРЕБОВАНИЯ К ПУБЛИКАЦИЯМ В ЖУРНАЛЕ «ВЕСТНИК РОНЦ им. Н. Н. БЛОХИНА РАМН»

Журнал «Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН» состоит из следующих разделов: «Экспериментальные исследования», «Клинические исследования», «Клинические лекции», «Случай из практики», «Обзорные статьи», «Хроники», «Дискуссия».

Статьи для разделов «Экспериментальные исследования» и «Клинические исследования» должны состоять из реферата, введения, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения и списка литературы; статьи для раздела «Случай из практики» — из реферата, краткой исторической справки (по желанию авторов), описания клинического наблюдения, обсуждения (по желанию авторов), заключения и списка литературы; статьи для разделов «Обзорные статьи» и «Клинические лекции» — из реферата, отдельных разделов (по желанию авторов), заключения и списка литературы.

Статья должна быть представлена в виде файла формата RTF на дискете или CD и распечатана в 2 экземплярах. В основном файле должны 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.), т. е. 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 присылать графики в виде файла Microsoft Excel с обязательным приложением в виде таблицы с данными, которые использованы для построения графика.

Обзорные статьи не должны превышать 24 страницы, оригинальные статьи и клинические лекции — 12 страниц, описания клинических наблюдений, рационализаторских предложений, хроникальных заметок, рецензий — 4 страницы текста.

Весь текст должен быть набран шрифтом Times New Roman 14, через полуторный интервал. Ширина полей: левое — 30 мм, верхнее — 20 мм, правое — 15 мм, нижнее — 20 мм. Текст должен быть выровнен по левому краю, не содержать переносов. Все страницы должны быть пронумерованы.

После названия статьи следует указать имена, отчества (полностью) и фамилии авторов, их ученые звания и должности, полное название учреждений (в том числе названия отделений, НИИ), в которых работают авторы, с указанием адреса, почтового индекса и e-mail. Кроме того, необходимо указать контактное лицо, адрес для переписки и e-mail (нужно иметь в виду, что все эти данные будут опубликованы). Затем должен следовать реферат, в котором кратко, без рубрикации должны быть указаны цель исследования, материалы и методы (количество больных, используемая методика), полученные автором результаты и основные выводы. Рекомендуемый объем

реферата — 500—1000 печатных знаков. В конце реферата автор приводит ключевые слова работы (не более 5).

Статья должна быть написана ясно, четко, лаконично, тщательно выверена авторами, не содержать повторов и исправлений. Наименования единиц (физических величин, результатов анализов) необходимо приводить по системе СИ. Сокращения допустимы только в отношении часто встречающихся в статье терминов. Они приводятся при первом вхождении в круглых скобках и в дальнейшем используются по всему тексту. Если сокращений больше 10, следует создать список сокращений. В тексте необходимо использовать международные названия лекарственных средств, которые пишутся с маленькой буквы. Торговые названия препаратов следует писать с большой буквы.

По тексту нужно дать ссылки на все таблицы и рисунки (например, табл. 1, рис. 1). 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. Размерность величин следует указывать через запятую. Таблица не должна содержать пустых ячеек (отсутствие данных должно отмечаться тире, «нет данных» или специальным примечанием). Все уточнения и локальные сокращения выносятся в подтабличные примечания. Каждое примечание нужно располагать с новой строки, помечать надстрочной буквой (а, б, в и т. д.).

Размер каждого рисунка должен быть не менее 10 × 10 см при разрешении не менее 300 dpi. Если под одной подписью планируется несколько рисунков (фотографий, рентгенограмм), каждый должен быть прислан отдельно и соответствовать указанному выше требованиям. Подпись к рисунку должна быть лаконичной, точно соответствовать его содержанию. Если несколько рисунков идут под общей подписью, то сначала приводят ее, а затем названия отдельных рисунков. В подписях к микрофотографиям следует указать методику микроскопии, увеличение, метод окраски материала.

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

Список литературы должен быть кратким и содержать не более 20 ссылок для статей из разделов «Экспериментальные исследования», «Клинические исследования», «Клинические лекции», «Случай из практики» и не более 100 ссылок для обзорных статей. Литературные источники перечисляют в списке литературы в порядке цитирования. В тексте статьи ссылки на литературу представляют в квадратных скобках.

Ссылки должны быть пронумерованы в соответствии с их положением в списке литературы. Все литературные источники, перечисленные в списке литературы, должны иметь соответствующую ссылку в тексте. Фамилии иностранных авторов приводятся в оригинальной транскрипции. В список литературы не включают ссылки на неопубликованные работы. Ссылки должны быть тщательно выверены авторами, которые несут ответственность за правильность приведенных данных.

В каждой ссылке должны быть указаны все авторы. Если авторов не более трех, их фамилии и инициалы пишут в начале ссылки, затем следуют название работы и выходные данные издания, если авторов четыре и более, то сначала пишут название работы, затем фамилии и инициалы всех авторов, затем выходные данные издания. Это касается ссылки на любые издания: книги, журналы, сборники и т. д.

Иванов И. И. Хронические гастриты. — 3-е изд. — М.: Медицина, 1986. — 148 с.

Хронические гастриты / Иванов И. И., Петров П. П., Сидоров С. С., Федоров Ф. Ф. — 3-е изд. — М.: Медицина, 1986. — 148 с.

При ссылке на книгу следует указывать авторов, название книги, номер издания (может отсутствовать), место издания, издательство (может отсутствовать), год и страницы (если автор ссылается на всю книгу, то пишется 150 с., если — на ее часть, то указывается С. 145—150), например:

Баадер В. Ю. Биогаз: теория и практика. — 3-е изд. — М.: Колос, 1986. — 148 с.

Schrier R. Manual of nephrology. — 4th ed. — New York: Little, Brown and company, 1995. — P. 170—187.

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

Кэйн Д. Этические и правовые основы медицинской помощи // Гинекология по Эмилю Новаку: Пер. с англ. / Под ред. Д. Берека, И. Адаши, П. Хиллард. — М.: Практика, 2002. — С. 14—18.

Cain J. Principles of patient care // Novak's Gynecology / Berek J., Adashi E., Hillard P. (eds.). — 12th ed. — Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. — P. 14—18.

При ссылке на журнал указывают авторов, название статьи, журнала (в традиционном сокращении), год, том, номер (может быть только том или номер) и страницы, например:

Заварзин Г. А. Трофические связи в метаногенном сообществе // Известия РАН. — 1996. — Т. 3, №6. — С. 34—36.

Хронические гастриты / Иванов И. И., Петров П. П., Сидоров С. С., Федоров Ф. Ф. // Гастроэнтерология. — 1996. — Т. 3, №6. — С. 34—36.

Fallowfield L. J. Psychological outcomes of different treatment policies in women with early breast cancer outside a clinical trial // BMJ. — 1990. — Vol. 3, N 5. — P. 575—580.

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

Кононенко 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, сроки ее проведения, страницы, например:

Кононенко Г. А. Решение уравнений движения однофазного вязкого закрученного потока в длинной трубе // Тез. докл. Всерос. науч.-тех. совещ., г. Иркутск, 19—21 апр. 1994 г. — С. 34—36.

Bailees M. D. The professional-client relationship // Proceedings of 17th International Cancer Congress, Rio de Janeiro, 23—28 Aug, 1998. — P. 596.

При ссылке на диссертации или авторефераты указывают автора, затем название диссертации, место и дату написания, страницы, например:

Бредикис Ю. И. Анатомическое и экспериментальное обоснование пункции сердца: Дис... канд. мед. наук. — М., 1957. — 157 с.

При этом используются следующие сокращения: «Дис... канд. мед. наук», «Дис... д-ра мед. наук», «Автореф. дис... канд. мед. наук», «Автореф. дис... д-ра мед. наук».

При ссылке на журналы, представленные в электронном доступе, следует указывать авторов и название статьи, название электронного журнала, год, номер, электронный адрес и дату обращения, например:

Иванова И. И. Развитие металлопроизводства в эпоху раннего металла [Электронный ресурс] // Вестн. РФФИ. — 1997. — №2. — URL: <http://www.rfbr.ru> (дата обращения: 01.01.2008).

Один из печатных вариантов работы должен быть обязательно подписан всеми авторами и руководителем подразделения, в нем должны содержаться контактные телефоны и e-mail.

Все статьи, поступившие в редакцию, подлежат рецензированию. Рецензенты назначаются редакционной коллегией журнала, которая имеет право отклонить работу из-за несоответствия профилю и требованиям журнала. В случае отказа в публикации редакция высылает авторам письмо с объяснением его причин. Плата за публикацию не взимается.

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 принимаются к публикации.

Передача рукописи в редакцию журнала «Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН» означает, что авторы статьи дают согласие на ее размещение в свободном доступе на сайтах www.ronc.ru и www.elibrary.ru.

Адрес редакции: 115478, РФ, Москва, Каширское шоссе, д. 24,
редакция журнала «Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН».
Телефон редакции: +7-499-324-5537. E-mail: vestnikronc@mail.ru