

ISSN 1726-9784

# РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№ 1 Том 5 2006 г.

УДК 616-085.2/3

## Учредители

ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН; НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей

## Главный редактор

А.Ю. Барышников, д-р мед. наук, проф.

## Заместители главного редактора

А.В. Караулов, член-кор. РАМН, Н.А. Оборотова, д-р фарм. наук, проф.

## Редколлегия

М.А. Барышникова, Н.А. Батурина, О.А. Бочарова, д-р биол. наук (Москва),  
Э.К. Возный, д-р мед. наук, проф. (Москва), А.К. Голенков, д-р мед. наук, проф. (Москва),  
Л.В. Демидов, д-р мед. наук, проф. (Москва), И.В. Евсегнеева, д-р мед. наук (Москва),  
П.К. Иванов, д-р мед. наук (Москва), З.Г. Кадагидзе, д-р мед. наук, проф. (Москва),  
И.Ю. Кубасова, канд. мед. наук (Москва), В.М. Моисеенко, д-р мед. наук, проф. (Санкт-Петербург),  
В.В. Новиков, д-р биол. наук, проф. (Нижний Новгород),  
Н.С. Сергеева, д-р мед. наук, проф. (Москва), Е.В. Степанова, канд. мед. наук (Москва),  
Н.Н. Тупицын, д-р мед. наук, проф. (Москва), С.А. Тюлядин, д-р мед. наук, проф. (Москва),  
Ю.В. Шишкин, д-р мед. наук (Москва), Р.И. Якубовская, д-р мед. наук, проф. (Москва)

## Редакционный совет

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

«Российский биотерапевтический журнал» является рецензируемым изданием

Подписной индекс 81679

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

Для медицинских учреждений бесплатно

Регистрационный номер:

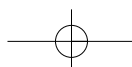
ПИ №77-11695 от 21.01.2002 г.

### Почтовый адрес:

115478 Москва, Каширское ш., 24  
НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей  
ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН  
Тел.: 323 57 00, 324-10-65; факс: 324 22 74;  
E-mail: [biotherapy\\_rbj@mail.ru](mailto:biotherapy_rbj@mail.ru)  
Интернет-версия: [www.rosoncoweb.ru/rbj/](http://www.rosoncoweb.ru/rbj/)  
ISSN электронной версии 1726-9792

Издательская группа РОНЦ:  
115478 Москва, Каширское шоссе, д. 24.  
Тел. (495) 324-2470; [publisher1@cancercenter.ru](mailto:publisher1@cancercenter.ru)

Объем 6,75 усл. печ. листов,  
подписано в печать 03.03.2006  
Тираж 1000 экз.



# СОДЕРЖАНИЕ

## Материалы V Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты»

<b>Биотерапия</b> .....	3
<b>Диагностика</b> .....	8
<b>Химиотерапия</b> .....	11
<b>Фотодинамическая терапия</b> .....	23
<b>Физические методы воздействия</b> .....	34
<b>Арглабин</b> .....	39
<b>Разное</b> .....	47
<b>Стендовые сообщения</b> .....	52
<b>Липосомы как транспортное средство для доставки биологически активных молекул</b> <i>Е. В. Толчева, Н. А. Оборотова</i> .....	54
<b>Термочувствительные липосомальные лекарственные формы в экспериментальной онкологии</b> <i>Н. А. Оборотова, А. А. Виланская, В. И. Прокофьева</i> .....	62
<b>Роль молекулярно-генетических маркеров в дифференциальной диагностике синхронного эндометриоидного рака яичников и тела матки</b> <i>Ю. Г. Паяниди, В. Ю. Сельчук, А. Ю. Асанов, К. И. Жордания, Т. И. Захарова</i> .....	71
<b>Изучение содержания растворимых форм мембранных антигенов у больных сахарным диабетом типа 2 при развитии диабетической ретинопатии</b> <i>А. В. Караулов, И. В. Евсегнеева, Е. Б. Тюленева, М. А. Крыжанова, Т. Г. Мартынова, В. В. Королева, Т. В. Чеснокова, В. В. Новиков</i> .....	75
<b>Изучение стабильности капсулированных лекарственных форм циклоспорина А</b> <i>А. П. Арзамасцев, Н. П. Садчикова, М. В. Ледовских, Е. Б. Нечаева, С. Г. Ларионова, С. Е. Милкина, В. Н. Байкова</i> .....	80
<b>Разработка новой лекарственной формы галавита в виде сублингвальных таблеток</b> <i>М. А. Барышникова, О. Л. Орлова, З. С. Шпрах, Е. М. Уколова, А. П. Полозкова, С. А. Партолина, Л. Н. Жилова, Л. П. Юдина, Н. А. Оборотова</i> .....	86
<b>Протективный эффект дендритных клеток при заражении мышей <i>Klebsiella pneumoniae</i></b> <i>Н. К. Ахматова, М. В. Киселевский, Е. А. Курбатова, А. И. Макашин, Б. Ф. Семенов</i> ...	91
<b>Действие грибов <i>Lentinus edodes</i> (Шиитаке) на рост подкожно перевитой аденокарциномы Эрлиха у мышей</b> <i>В. П. Дерягина, Н. И. Рыжова, А. Н. Разин, И. А. Филиппова, М. Ю. Волков, О. А. Бочарова</i> .....	98

# БИОТЕРАПИЯ

Л. З. Болиева<sup>1</sup>, Ф. К. Джисоев<sup>1</sup>, А. В. Сергеев<sup>2</sup>,  
М. Я. Шапкина<sup>2</sup>

## Влияние каскатола и селена на возникновение опухолей молочной железы, индуцированных N-метил-N-нитрозомочевинной

<sup>1</sup> Северо-осетинская государственная медицинская академия, Владикавказ

<sup>2</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

**Введение.** Многочисленные эпидемиологические исследования убедительно продемонстрировали обратную зависимость между поступлением в организм человека бета-каротина (БК), аскорбиновой кислоты (АК), токоферилацетата (ТФ), селена (СЕЛ) и риском развития рака.

**Цель исследования.** Изучение ингибирующего влияния БК, препарата каскатол (КАС-комплекс БК, АК, ТФ) и СЕЛ на возникновение опухолей молочной железы (ОМЖ) у крыс, индуцированных N-метил-N-нитрозомочевинной (МНМ).

**Материал и методы.** ОМЖ индуцировали 170 крысам-самкам линии Wistar 5-кратным с недельным интервалом подкожным введением МНМ в область одной и той же МЖ в разовой дозе 2,5 мг на животное. Исследуемые препараты вводили крысам ежедневно, начиная с 1-го дня инъекции МНМ (1-й режим введения) или через 3 сут после МНМ (2-й режим) до конца опыта (31–37 нед.).

**Результаты.** МНМ индуцировала у крыс ОМЖ, гистологически квалифицированные как аденокарцинома. БК снижал частоту возникновения ОМЖ до 47 % при 1-м режиме введения и до 50 % — при 2-м. Средний латентный период появления ОМЖ увеличивался соответственно на 84,8 и 56,3 %, а продолжительность жизни животных — на 41,5 и 24,4 %. Применение одного КАС или КАС с СЕЛ приводило к достоверному снижению частоты ОМЖ до 63,2 и 50 % соответственно. Латентный период появления опухолей увеличился на 28,9 и 32,3 %, а средняя продолжительность жизни выросла на 34,9 и 44,4 % соответственно. Выявлено также замедление темпов роста ОМЖ и повышение выживаемости животных.

**Выводы.** БК, КАС и СЕЛ при раздельном и комбинированном применении оказывали ингибирующее влияние на канцерогенез молочной железы, индуцированный у крыс МНМ.

## А. А. Борунова, Г. З. Чадава, Т. Н. Заботина, Л. В. Демидов Динамика экспрессии антигена CD25 на поверхности лимфоцитов больных меланомой при вакцинотерапии

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

**Цель исследования.** Оценить изменения экспрессии активационного антигена CD25 на поверхности лимфоцитов больных меланомой на фоне вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками, нагруженными опухолевыми антигенами больного.

**Материал и методы.** Были исследованы больные с диагнозом диссеминированная меланома ( $n=14$ ), получившие более 10 введений вакцины. Клинически у 7 пациентов до начала вакцинотерапии опухоль и метастазы были полностью удалены (1-я группа), у 7 — наблюдались метастатические изменения (2-я группа). В качестве контрольной группы изучали лимфоциты здоровых доноров ( $n=10$ ). Иммунофенотип лимфоцитов периферической крови исследовали в реакции иммунофлуоресценции с МКА, конъюгированными FITC и PE, с последующим анализом на проточном цитофлуориметре. Экспрессию антигена CD25 изучали на поверхности Т-лимфоцитов (CD4 и CD8) и NK-клеток (CD16).

**Результаты.** При исследовании было выявлено, что для больных без опухолевой массы (1-я группа) до начала терапии характерна высокая экспрессия антигена CD25 ( $28,2 \pm 6,9$  %), тогда как во 2-й группе уровень экспрессии этого антигена был в пределах нормы. На фоне вакцинотерапии уже после 3-го введения наблюдалось увеличение CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов в 2 группах ( $35,5 \pm 4,2$  и  $29,9 \pm 6,8$  % соответственно). При последующих введениях в 1-й группе количество CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов снижалось до нормальных значений, а у больных 2-й группы сохранялся высокий уровень экспрессии мо-

лекулы CD25 (30–35 %). Исследование распределения экспрессии антигена CD25 на поверхности CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- и CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов показало, что у больных 1-й группы увеличение CD25<sup>+</sup>-клеток было преимущественно за счет CD8<sup>+</sup>-популяции лимфоцитов. В то же время популяции CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> и CD16<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> оставались в пределах нормы как до начала терапии, так и на фоне лечения. У больных 2-й группы количество CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов до начала лечения было выше нормы и сохранялось на этом уровне на фоне последующих введений, а наблюдаемое в процессе лечения увеличение уровня экспрессии антигена CD25 происходило преимущественно за счет CD16<sup>+</sup>-клеток.

**Выводы.** Таким образом, на фоне вакцинотерапии у больных 2 групп наблюдается различная динамика экспрессии антигена CD25 на поверхности лимфоцитов периферической крови. В 1-й группе больных увеличение CD25<sup>+</sup>-клеток происходило за счет CD8<sup>+</sup>-популяции Т-лимфоцитов, а во 2-й — за счет CD16<sup>+</sup>-популяции NK-клеток.

Н. Г. Кормош, С. М. Ситдикова, Б. С. Аманджолов,  
К. П. Лактионов, М. В. Киселевский, Ф. В. Доненко

## Сравнительное изучение эффективности современных вакцин, содержащих различные опухолеассоциированные антигены

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

В настоящем исследовании приведены результаты применения оригинальной вакцины на основе аутогенного муцина содержащего антиген CA 125 (CA 125-вакцина) у больных раком яичников III–IV стадии. Антиген выделен у 10 больных, однако в 5 случаях вакцину не вводили из-за быстрого прогрессирования заболевания и гибели больных. CA 125-вакцина введена 5 больным. Минимальный курс вакцинотерапии составил 5 введений, максимальный — 15. Побочных реакций отмечено не было. У 2 из 5 больных после 3-го введения CA 125-вакцины наступило субъективное улучшение состояния, отмечена положительная динамика по данным УЗИ, стабилизация уровня онкомаркера. В обзоре А. Walker (2004) отмечено, что по крайней мере три противоопухолевые вакцины — LipoNova, CancerVax, Dendreon — показали в рандомизированных исследованиях свою эффективность. Так, в течение 70 мес. наблюдения 558 больных прогрессирование заболевания не наблюдали у 72 % больных, получивших вакцину LipoNova, и у 59,3 % невакцинированных. У 263 больных, получивших вакцину CancerVax, эти результаты составили 39 и 19 % соответственно.

Таким образом, мировой опыт использования противоопухолевых вакцин показывает, что их эффективность колеблется от 12,7 до 20 %. В нашем случае из 10 взятых в исследование больных положительный эффект получен у 2, что также составляет 20 %. CA 125-вакцина является единственной используемой при опухолях женской репродуктивной системы. Мы надеемся, что при дальнейшем изучении CA 125-вакцины у очень тяжелой категории больных раком яичников ее эффективность будет сравнима с таковой уже применяемых противоопухолевых вакцин.

В. П. Краснов<sup>1</sup>, Г. Л. Левит<sup>1</sup>, А. М. Демин<sup>1</sup>, И. А. Низова<sup>1</sup>,  
А. Ю. Вигоров<sup>1</sup>, Е. А. Жданова<sup>1</sup>, А. В. Осинцев<sup>1</sup>,  
Е. В. Степанова<sup>2</sup>, Е. М. Трещалина<sup>2</sup>

## Исследование антиангиогенной активности структурных аналогов талидомида

<sup>1</sup> Институт органического синтеза УрО РАН, Екатеринбург

<sup>2</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

**Цель и задачи.** В последнее время широко проводятся исследования антиангиогенных соединений как потенциальных противоопухолевых препаратов. Нами были разработаны методы синтеза структурных аналогов талидомида — различных производных N-фталойл-аминокислот, в первую очередь C(4)-производных глутаминовой кислоты, N-фталойламиноспиртов, N-фталойльных производных каркасных соединений, а также проведено изучение их антиангиогенной активности в опытах *in vitro*.

**Материал и методы.** Синтез стереоизомеров C(4)-производных глутаминовой кислоты, потенциальных биологически активных соединений, был основан на реакциях нуклеофильного замещения галогена в 4-галогенпроизводных глутаминовой кислоты. Для анализа смесей стереоизомеров использовались методы ВЭЖХ и ЯМР-спектроскопии.

Исследование антиангиогенной активности проводили с использованием методов ингибирования bFGF, стимулированной пролиферации культуры эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10; ингибирования миграции культуры эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10 (метод «раневого поверхности»), ингибирования образования трубчоподобных структур эндотелиальными клетками SVEC-4-10.

**Результаты.** Синтезированы и переданы для оценки антиангиогенной активности 16 соединений. Большую трудность представляла низкая растворимость некоторых из синтезированных веществ в средах, используемых для проведения эксперимента. Среди них выявлено 4 соединения, активно влияющих на пролиферативную активность культуры эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10. Эти препараты оказывают антипролиферативный эффект на клетки в концентрации  $10^{-3}$ – $10^{-5}$  М, а также частично блокируют образование капилляроподобных структур и миграцию эндотелиальных клеток.

**Выводы.** В рамках настоящего проекта разработаны методы получения 4 производных глутаминовой кислоты, а также аналогов известных противовоспалительных препаратов. Проведено исследование их способности ингибировать ангиогенез в опытах *in vivo*. Наиболее активные из полученных соединений могут представлять интерес в качестве основы для создания противоопухолевого препарата.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант 04-03-96006.*

*Г. Кульчар*

#### **Теоретические предпосылки использования кулевита как пищевой добавки и опыт его практического применения**

*Отделение Биохимии, факультет Медицины Университета Пеца, Венгрия*

При ВИЧ-инфицировании, несмотря на глобальные изменения в иммунной системе, развиваются только несколько типов опухолей. На основе клинических наблюдений можно предположить, что даже в этих случаях причина малигнизации не в дефектах иммунной системы. Вероятно, возникновение опухоли не является следствием недостаточности иммунной системы. Это предположение свидетельствует о том, что известная сегодня система иммунной защиты организма не играет существенной роли в возникновении опухоли. Многие исследователи изучают механизмы ухода от иммунного надзора или заняты поиском иммуномодуляторов. Мы выбрали третье направление. Согласно нашей концепции, тот факт, что опухоль не развивается в большинстве популяций в течение всей жизни, несмотря на неэффективность иммунной системы, указывает на существование других защитных систем клетки. Понятно, что компоненты защитного механизма должны присутствовать в циркулирующей системе организма. Не вызывает сомнений, что захват малых субстратов (аминокислот, моносахаридов, нуклеотидов и др.) нормальной, в отличие от опухолевой, клеткой — строго регулируемый процесс. Именно благодаря этим закономерностям опухолевая клетка аккумулирует контрастные вещества. Подобные качества опухолевой клетки могут быть фатальными для нее вследствие аккумуляции веществ, которые при высокой концентрации становятся токсичными для клетки. Способность таких соединений убивать опухолевую клетку формирует ранее неизвестную защитную систему, которую мы назвали ППЗС — пассивная противоопухолевая защитная система.

Мы выбрали 16 компонентов из 89 циркулирующих в крови и показали, что эта смесь действительно обладает цитотоксическим эффектом (индуцирует апоптоз) в различных опухолевых линиях клеток. Этот эффект также подтвержден на животных. Смесь из 16 соединений применяли как препарат не только в Венгрии, но и в других странах, включая Россию. На основании дополнительных экспериментов стало известно, что пролиферация опухолевых клеток начинает конкурировать с их гибелью. Соотношение гибели к делению и размножению клеток определяет в конечном итоге ос-

тановку пролиферации опухоли и ее регрессию. Эти данные запатентованы Immunal Ltd., Budapest, Hungary.

Также получены данные о том, что смесь из 16 соединений (ингредиенты таблеток кулевит) улучшает эффективность химиотерапии и снижает ее побочные эффекты. Кулевит разрушает резистентные к химиотерапии клетки, предотвращая рецидив. Эти данные подтверждены клиническими испытаниями, что может послужить аргументом в пользу применения таблеток кулевит совместно с другими методами клинического лечения.

#### **М. Ю. Ларин<sup>1</sup>, П. К. Иванов<sup>1</sup>, Д. Ю. Блохин<sup>1</sup>, В. И. Филиппов<sup>2</sup>, О. Л. Еришов<sup>2</sup>, Н. Г. Мошечков<sup>3</sup> Стандартизации магнитоуправляемого иммуносорбента ФерроДекс-115**

<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>2</sup> ООО НПО «МедБиоСпектр», Москва

<sup>3</sup> ФГУП ЦНИИТОЧМАШ, Климовск, Московская область

Цель настоящей работы состояла в определении критериев оценки и создании методов стандартизации препарата ФерроДекс-115, предназначенного для выделения гемопоэтических стволовых клеток человека из костного мозга и периферической крови методом иммуномагнитной сепарации.

Ключевой особенностью иммуносорбента ФерроДекс-115 является его магнитовосприимчивость, т. е. способность к магнитофорезу — направленному движению в неоднородном магнитном поле. Основой для ФерроДекс-115 служит магнетит (смешанный оксид железа  $Fe_3O_4$ ), являющийся мягким ферромагнетиком, поэтому количественной характеристикой магнитовосприимчивости выступает намагниченность насыщения. Другая важная особенность сорбента состоит в том, что его частицы обладают небольшим по величине собственным магнитным моментом в отсутствие внешних магнитных полей, что обуславливает устойчивость препарата к спонтанной агрегации. Количественной характеристикой в данном случае является остаточная намагниченность. Для оценки магнитных свойств нами были использованы магнитные весы Фарадея и вибрационный магнитометр.

Важную роль для возможности применения иммуносорбента ФерроДекс-115 в магнитных сепараторах различных модификаций играет седиментационная устойчивость суспензии. Количественно она характеризуется плавучей плотностью частиц иммуносорбента. Оценка последней осуществляется методом центрифугирования в растворах сахарозы различной плотности.

Большое значение имеет распределение частиц сорбента по размерам. Монодисперсность во многом обуславливает стабильность ряда физико-химических характеристик препарата. Размеры частиц важны еще и потому, что гемопоэтические стволовые клетки, выделенные с помощью препарата ФерроДекс-115, планируется вводить пациентам без отделения от частиц сорбента. Оценка дисперсии размеров частиц проводили методом корреляционной спектроскопии светорассеяния на приборе Nicomp 380 (NicomP PSS).

В результате проведенных исследований определены критерии оценки основных физико-химических характеристик препарата магнитоуправляемого иммуносорбента ФерроДекс-115, служащие для его стандартизации: намагниченность насыщения  $18$ – $22$   $kA \cdot m^{-1}$ , остаточная намагниченность не более  $0,5$   $kA \cdot m^{-1}$ , плавучая плотность  $1,06$ – $1,08$   $г \cdot см^{-3}$ , размеры частиц  $50$ – $200$  нм при объемной доле фракции частиц размером  $70$ – $100$  нм не менее  $90$  %.

*И. Н. Михайлова, Г. З. Чкадуа, А. А. Борунова, Н. Н. Петенко, Е. В. Огородникова, Л. Ю. Вишнякова, С. А. Хатьмев, Е. А. Черемушкин, К. С. Титов, З. Г. Кадагидзе, Л. В. Демидов, А. Ю. Барышников  
Аутологичная дендритноклеточная вакцина в лечении диссеминированной меланомы  
ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*

**Введение.** Меланома относится к иммуногенным опухолям, поэтому разработка методов специфической иммунотерапии для данной нозологии представляется актуальной.

**Цель исследования.** Изучить влияние аутологичной дендритноклеточной вакцинотерапии на иммунный ответ и клиническое течение диссеминированной меланомы.

**Материал и методы.** Применялась противоопухолевая вакцина на основе аутологичных дендритных клеток (ДК), нагруженных опухолевым лизатом. ДК вводились внутрикожно в несколько точек (от 2 до 10) вблизи регионарных лимфатических коллекторов. Однократная доза введения —  $1-5 \times 10^6$  клеток, интервал между вакцинациями — 2–4 нед., кратность введения — до прогрессирования заболевания. Оценка иммунологической и клинической эффективности производилась с помощью следующих методов: фенотипирование лимфоцитов периферической крови в динамике, степень РГЗТ, оценка объективного клинического ответа, безрецидивной выживаемости. С 2003 по 2005 г. в исследование включено 37 пациентов, которые были разделены на две клинические группы: 1) пациенты с метастатической меланомой (регионарные и/или отдаленные метастазы), получающие вакцину в терапевтическом режиме в виде монотерапии ( $n=13$ ), причем  $T_{\text{люб}}N_{1-3}M_0$  — 15 %,  $T_{\text{люб}}N_{\text{люб}}M_1$  — 85 %; 2) пациенты с аналогичной распространенностью процесса после радикального оперативного вмешательства, получающие лечение в профилактическом режиме ( $n=24$ ), причем  $T_{\text{люб}}N_{1-3}M_0$  — 46 %,  $T_{\text{люб}}N_{\text{люб}}M_1$  — 54 %. Почти всем пациентам (84 %) до начала вакцинотерапии проводилось комбинированное лечение, на фоне которого отмечено прогрессирование заболевания.

**Результаты.** В 1-й группе 13 пациентов получили 145 вакцинаций (от 3 до 21 введений, в среднем 11,2), время наблюдения от 1 до 27 мес. Стабилизация заболевания (от 9 до 27 мес.) отмечена у 5 (38 %) больных, прогрессирование заболевания — у 8 (62 %). Во 2-й группе 24 пациента получили 173 вакцинации (от 2 до 30 введений, в среднем 7,2), время наблюдения от 2 до 24 мес. Без признаков прогрессирования заболевания за время наблюдения остаются 16 (67 %) больных, прогрессирование заболевания произошло у 6 (25 %). Не оценено 2 (8 %) наблюдения.

При изучении иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови больных 2 групп на фоне вакцинотерапии было выявлено увеличение количества Т-лимфоцитов (преимущественно за счет CD8<sup>+</sup>) и NK-клеток, а также уровня экспрессии активационных антигенов на их поверхности. В местах введения вакцины отмечались местные реакции в виде покраснения от 5 до 30 мм, зуда, расцененные как проявление РГЗТ.

**Выводы.** Данный метод лечения хорошо переносим. При отсутствии объективной клинической эффективности в терапевтической группе в 38 % случаев наблюдалась длительная стабилизация заболевания. Отмечена стимуляция противоопухолевого ответа иммунной системы в виде активации эффекторного звена клеточного иммунитета.

*И. Н. Михайлова<sup>1</sup>, П. В. Иванов<sup>2</sup>, М. И. Лукашина<sup>1</sup>, Л. Ф. Морозова<sup>1</sup>, О. С. Бурова<sup>1</sup>, Н. Н. Петенко<sup>1</sup>, Е. А. Черемушкин<sup>1</sup>, Г. З. Чкадуа<sup>1</sup>, Л. В. Демидов<sup>1</sup>, А. Ю. Барышников<sup>1</sup>*

#### **Иммунные реакции кожи у больных меланомой при проведении вакцинотерапии**

<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>2</sup> Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова

**Цель исследования.** Изучение лимфоидных структур кожи пациентов с меланомой кожи при проведении им внутрикожной вакцинации.

**Материал и методы.** Посредством стандартных и иммуногистохимических методик окраски были исследованы биоптаты кожи 9 пациентов в возрасте от 35 до 58 лет с меланомой различной локализации, проходящих курсы иммунотерапии. Пациентам 1-й группы проводилась внутрикожная вакцинация модифицированными аллогенными клетками, 2-й группы — вакцинация аутологичными дендритными клетками, нагруженными опухолевыми антигенами, *in vitro*. Биопсия кожи выполнялась из симметричных лопаточных областей накануне вакцинации и в различные сроки после.

**Результаты.** У пациентов 1-й группы наибольшая выраженность изменений клеточного состава отмечалась в первые дни после вакцинации, проявляясь в значительном увеличении объема скопления клеток вокруг сосудов (периваскулярных узелков) сосочкового и сетчатого слоев дермы смешанного состава. Иммуногистохимически инфильтраты состояли преимущественно из Т-лимфоцитов, В-клетки были представлены в незначительном коли-

честве в составе периваскулярных узелков и сетчатом слое дермы, также отмечалось наличие в составе инфильтратов дендритных клеток (ДК).

Биоптаты, взятые неделю спустя, характеризовались менее выраженным увеличением объема периваскулярных узелков сетчатого слоя, изменением пропорции Т- и В-клеточного состава узелков в пользу В-клеток, а также снижением количества ДК вокруг сосудов и увеличением их концентрации в сосочковом слое. Спустя 2 нед. выявлено значительное снижение числа Т-клеток с одновременным повышением В-лимфоцитов в составе периваскулярных узелков без выраженного изменения их объема. Отмечалось также существенное увеличение количества ДК вокруг сосудов (за неделю до 2-й биопсии пациенту была проведена повторная вакцинация).

Среди пациентов 2-й группы в первые дни после вакцинации отмечались выраженные периваскулярные инфильтраты смешанного состава (лимфоциты, макрофаги, плазмоциты, моноциты, базофилы, нейтрофилы), а также умеренная инфильтрация концевых отделов потовых и сальных желез. Иммуногистохимическая окраска выявляла в составе инфильтратов в основном Т-лимфоциты. Биоптаты более поздних сроков варьировали по клеточному составу в зависимости от интервала между биопсиями, количества промежуточных вакцинаций. Отмечалось наличие умеренно выраженных периваскулярных и перигландулярных инфильтратов смешанного состава с преобладанием Т-лимфоцитов (7–10 дней), приблизительно равным соотношением Т- и В-клеток (19–20 дней), а также наличие небольших скоплений в дерме дендритных клеток (CD83) (20–21-й день).

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта «Terry Fox Run».*

*И. Н. Михайлова<sup>1</sup>, Е. С. Воронина<sup>2</sup>, Н. М. Дышева<sup>3</sup>, Л. Ф. Морозова<sup>1</sup>, О. С. Бурова<sup>1</sup>, Е. А. Черемушкин<sup>1</sup>, Л. В. Демидов<sup>1</sup>, А. Ю. Барышников<sup>1</sup>*

#### **Кариологическое исследование клеточных линий меланомы кожи человека**

<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>2</sup> ГУ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

<sup>3</sup> Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова

Одним из новых селективных и эффективных методов противоопухолевой терапии является использование генно-инженерных противоопухолевых вакцин. Для создания таких вакцин требуется тщательное изучение применяемых клеточных линий, в связи с чем кариологическое исследование является необходимым этапом, позволяющим более оптимально подбирать клеточные линии для разработки противоопухолевых вакцин.

Проведено кариологическое исследование 8 клеточных линий меланом. Фиксацию клеток проводили стандартным способом. Готовые препараты окрашивали по G-методу. Кариологическое исследование включало относительную оценку размера ядер, характер их окраски, состояние хроматина и кариотипический анализ (число хромосом, симметричные транслокации в длинных хромосомах, наличие или отсутствие идентичных перестроенных хромосом в разных метафазах, нестабильные хромосомные aberrации).

Все изученные культуры характеризуются измененным хромосомным набором как по числу хромосом, так и по их структуре. Модальное число хромосом в 3 культурах соответствует диплоидному набору, в 5 — триплоидному. В 4 культурах встречаются клетки с удвоенным по сравнению с основным пулом клеток числом хромосом (тетра- и гексаплоидные клетки соответственно). Эти культуры характеризуются различающимися диаметрами ядер при одной и той же плотности окраски и состоянии хроматина, характерного для интерфазных ядер. Принимая во внимание дублированность структурных аномалий хромосом (например, кольцевой хромосомы), можно утверждать, что речь идет не о двух различных линиях клеток в одной культуре, а о повышенной полиплоидизации в этих культурах. Числовые нарушения затрагивали также и отдельные хромосомы, наиболее характерна полисомия по хромосоме 7. Структурные перестройки включали в себя транслокации, делеции, инверсии, дупликации. Наиболее часто они затрагивали хромосомы 1, 6, 7 и хромосомы группы D. Три культуры характеризовались высоким уровнем

нестабильных хромосомных aberrаций (хроматидные и хромосомные обмены).

*Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Москвы в рамках научно-технической программы «Разработка и внедрение в медицинскую практику новых методов и средств диагностики и лечения онкологических и других заболеваний».*

*А. В. Сергеев<sup>1</sup>, М. Я. Шапкина<sup>1</sup>, С. А. Хрусталева<sup>1</sup>,  
Е. Н. Анашкина<sup>1</sup>, С. М. Галачиев<sup>2</sup>, Ф. К. Джисоев<sup>2</sup>,  
А. В. Погабало<sup>3</sup>, Т. В. Силаева<sup>1</sup>*

#### **Иммуномодулирующая и антиоксидантная активность экстракта корня солодки**

<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>2</sup> Северо-осетинская государственная медицинская академия, Владикавказ

<sup>3</sup> Государственная классическая академия им. Маймонида, Москва

**Введение.** Широкий спектр фармакологической активности экстракта корня солодки (ЭКС) обусловлен наличием глицирризиновой и глюкоуроновой кислот (ГЛК), суммой флавоноидов и рядом других соединений. Иммуномодулирующие и антиоксидантные свойства ЭКС и препаратов на его основе могут найти применение в профилактике и лечении онкологических заболеваний.

**Цель исследования.** Изучение влияния ЭКС на иммунотоксичность, индуцированную цитостатиками, и на токсичность при хроническом свинцовом отравлении.

**Материал и методы.** Лиофилизированный ЭКС получен по специальной технологии и содержал не менее 20 % ГЛК. Пролиферативную активность спленоцитов (ПАС) мышей BALB/c определяли по включению <sup>3</sup>H-тимидина в ДНК лимфоцитов, трансформированных митогеном Кон А или аллоантигенами в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) селезенки аллогенных мышей, а специфический цитолитический Т-киллеров из СКЛ — по выходу изотопа <sup>51</sup>Cr из клеток-мишеней. Хроническую свинцовую интоксикацию у крыс линии Wistar вызывали ежедневным скормливанием животным 30 мг/кг ацетата свинца (АСВ).

**Результаты.** Ежедневное введение мышам BALB/c ЭКС в дозе 0,02–0,1 г/кг приводило через 4–6 нед. к 1,5–3-кратному увеличению ПАС и дополнительному образованию Т-киллеров в СКЛ. Предварительное многократное введение мышам ЭКС в дозе 0,1 г/кг снижало на 40–60 % иммунотоксичность, индуцированную циклофосфаном или аранозой, которая выражалась в 2–3-кратном подавлении ПАС и образовании Т-киллеров в СКЛ. Хроническое ежедневное введение крысам АСВ приводило через 6–12 мес. к повышению смертности животных на 45–50 %, снижению массы тела на 40–45 %, уровня гемоглобина и эритроцитов на 35–40 %, появлению ретикулоцитов и лейкопении. Одновременное введение крысам АСВ и ЭКС в дозе 0,05 г/кг достоверно (на 20–30 %) уменьшало показатели смертности, снижения массы тела и гематологические симптомы интоксикации.

**Выводы.** Препараты на основе ЭКС могут найти применение для снижения токсичности в комплексной терапии рака и для профилактики онкологических заболеваний, особенно в группах риска.

*В. А. Филов, А. М. Беркович*

#### **Олипифат и его модифицированный аналог лигфол — новые отечественные препараты из класса окисленных лигнинов**

*ГУ НИИ онкологии им. проф. Н. Н. Петрова, Санкт-Петербург  
Фармацевтическая фирма «Лигфарм», Москва*

Новый оригинальный препарат олипифат, полученный из лигнина медицинского, проявил заметный противоопухолевый эффект в эксперименте на лабораторных животных. При этом он практически лишен токсичности. В настоящий момент заканчиваются клинические испытания олипифата при меланоме и раке почки. При других локализациях злокачественных опухолей человека препарат к существенным положительным эффектам не приводил.

В ветеринарии оказался весьма полезен модифицированный препарат лигфол. Он проявил высокую активность при лечении доброкачественных и злокачественных опухолей домашних животных, в первую очередь, опухолей молочной железы у кошек и собак. Эффективность лигфола проявляется длительными ремиссиями — до года и более. Нередки случаи полного выздоровления даже при дале-

ко зашедших процессах. Применение лигфола при лучевой терапии и лечении цитостатиками обеспечивает снижение токсических эффектов и приводит к потенцированию противоопухолевого действия. Препарат полифункционален. Помимо указанных свойств он обладает выраженным адаптогенным эффектом, оказывает иммуномодулирующее действие, является весьма эффективным репаратом, что показано в разных лабораториях и подтверждено исследователями-практиками. Все эти качества могут быть с пользой применены в онкологической практике. В частности, ранозаживляющий эффект лигфола выше, чем от применения других репаратомов.

Касаясь механизмов действия препарата, можно предполагать ведущую роль иммуноантиоксидантных свойств. Показана его антирадикальная активность, активизация антиоксидантной защиты и иммунокомпетентных органов, мобилизация фагоцитов.

*А. А. Фильченков<sup>1</sup>, В. А. Каминский<sup>2,3</sup>, М. П. Завелевич<sup>1</sup>,  
Р. С. Стойка<sup>2,3</sup>*

#### **Активация каспазной системы в клетках лимфобластного лейкоза человека при индукции апоптоза алкалоидами хелидонина и сангвинарином**

<sup>1</sup> Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии НАН Украины, Киев

<sup>2</sup> Институт биологии клетки НАН Украины, Львов

<sup>3</sup> Львовский национальный университет

**Цель исследования.** Активация каспазной системы при индукции апоптоза играет важную роль в реализации цитотоксического действия большинства известных противоопухолевых препаратов. Значение этой системы в действии индивидуальных алкалоидов чистотела практически не исследовано. В данной работе изучена способность хелидонина и сангвинарина индуцировать апоптоз и активировать каспазную систему в перевиваемых клетках линии МТ-4 острого лимфобластного лейкоза человека.

**Материал и методы.** Индукцию апоптоза и образование в клетках активной формы каспазы-3 определяли с помощью проточной цитофлуориметрии (окраска клеток пропидия йодидом или использование набора mAb Apoptosis Kit FITC фирмы BD Biosciences Pharmingen, США). Для оценки уровня цитохрома *c* (в цитоплазматической фракции), а также прокаспазы-8 и -9, зрелой формы каспазы-8 и -9 использовали иммуноблоттинг с применением моноклональных антител против указанных белков (BD Biosciences Pharmingen и Beckman Coulter, Inc., США). Выявление соответствующих антигенов осуществляли специфическими антисыворотками с титром 1:1000 в течение 12 ч при температуре 4 С. Результаты анализа были визуализированы после связывания вторичных антител и количественной оценки активности конъюгированной с ними пероксидазы.

**Результаты.** Обработка клеток МТ-4 хелидонин или сангвинарином в концентрации 2,5 и 1 мкг/мл вызывала существенную гибель клеток: содержание гиподиплоидных (апоптотических) клеток через 24 ч после добавления препарата в среднем составляет 34 и 25 % соответственно. После культивирования клеток МТ-4 с хелидонин или сангвинарином в них активируется каспаза-3. В клетках, обработанных как хелидонин, так и сангвинарином, выявлен выход цитохрома *c* (м.м. 12 кДа) в цитозоль, а также появление каспазы-9 (м.м. 34 кДа) на фоне уменьшения уровня ее предшественника (м.м. 45 кДа). В то же время в обработанных этими алкалоидами клетках обнаружена только неактивная форма прокаспазы-8 (м.м. 55 кДа).

**Выводы.** Таким образом, хелидонин и сангвинарин являются типичными индукторами апоптоза митохондриального типа, для которого характерны выход цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму, активация инициаторной каспазы-9 и эффекторной каспазы-3, которые происходят без вовлечения компонентов рецептор-опосредованного пути (каспаза-8) передачи апоптогенного сигнала.

*Е. Л. Членова<sup>1</sup>, Л. М. Михайлова<sup>1</sup>, М. Ю. Ларин<sup>1</sup>,  
И. Б. Меркулова<sup>1</sup>, О. И. Коняева<sup>1</sup>, Н. П. Ермакова<sup>1</sup>,  
Н. Ю. Кульбачевская<sup>1</sup>, Т. В. Абрамова<sup>1</sup>, Н. Г. Мошечков<sup>3</sup>,  
В. И. Филиппов<sup>2</sup>, О. Л. Еришов<sup>2</sup>, Д. Ю. Блохин<sup>1</sup>,  
П. К. Иванов<sup>1</sup>*

#### **Токсичность и побочное действие иммуномагнитного сорбента ФерроДекс-115**

<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>2</sup> ООО Научно-производственный центр «МедБиоСпектр», Москва

<sup>3</sup> ФГУП ЦНИИТОЧМАШ, Климовск, Московская область

**Введение.** ФерроДекс-115 — новый отечественный иммуномагнитный сорбент, используемый в иммуномагнитной сепарации стволовых гемопоэтических клеток для выделения CD34<sup>+</sup>-клеток для их последующей аутотрансплантации.

**Цель исследования.** Изучение токсичности и побочного действия ФерроДекс-115 для оценки его безвредности при клиническом применении.

**Материал и методы.** Исследования проведены на 60 мышах-гибридах F<sub>1</sub> (СВА×С<sub>57</sub>Bl/6j), 60 неинбредных крысах, 40 морских свинках, 12 кроликах породы шиншилла и 8 собаках породы английский бигл. При изучении острой и субхронической токсичности ФерроДекс-115 вводили внутривенно однократно и многократно (ежедневно в течение 5 дней) грызунам в диапазоне доз от 9 до 450 мг/кг, собакам — от 2,5 до 62,5 мг/кг. Оценку влияния ФерроДекса-115 на органы и системы животных проводили функциональными, лабораторно-инструментальными и патоморфологическими методами исследования в течение 30–60 дней (Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — ФК МЗ РФ. — М., 2005).

**Результаты.** Определены уровни токсических доз на животных при однократном и многократном введении ФерроДекса-115. Установлена хорошая переносимость препарата животными в условиях как острого, так и субхронического эксперимента при применении в дозах, превышающих предполагаемую начальную (стартовую) дозу для человека в 4–30 раз (мыши), 10–50 раз (крысы), 2,5 раза (собаки). ФерроДекс-115 не влияет на общее состояние животных, не вызывает их гибели, не оказывает токсического влияния на органы и системы организма животных. ФерроДекс-115 при введении собакам в дозах, превышающих предполагаемую дозу для человека в 10 раз (однократное введение) и в 25 раз (многократное введение), оказывает побочное действие на функции ЖКТ (эметическое действие), печени (увеличение активности трансаминаз), вызывает нейротпатию у животных. Риск развития указанных побочных эффектов способствует увеличению скорости введения препарата более 60 мл/ч. Гистотоксикологические исследования показали, что препарат вызывает морфологические изменения в легких (микроочаги воспалительных изменений), печени и почках (мелкоочаговые дистрофические изменения). Побочное действие носит пролонгированный дозозависимый характер.

**Выводы.** Иммуномагнитный сорбент ФерроДекс-115 рекомендуется для проведения клинических исследований.

*В. И. Шардаков*

### Применение дерината в лечении онкологических больных

ФГУ Кировский НИИ гематологии и переливания крови

**Цель исследования.** Оценка иммунокорригирующих и миело-стимулирующих свойств отечественного препарата деринат (ЗАО ФП «Техномедсервис»), Москва).

**Материал и методы.** У 20 пациенток после комплексной терапии рака молочной железы, включавшей лучевое, оперативное и химиотерапевтическое воздействие, оценивались миело- и иммуностимулирующие свойства дерината, который вводился больным по следующей схеме: внутримышечно 5 мл 1,5% раствора (75 мг дерината) первые 5 инъекций через 2 дня, последующие 5 инъекций — через 3 сут, т. е. курсовая доза препарата составляла 750 мг. У наблюдаемых больных исследовались количественные показатели периферической крови, а также определялось число лимфоцитов с маркерами CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>. Оценивалась функциональная активность нейтрофилов в латекс- и НСТ-тестах. В сыроворотке крови исследовался уровень иммуноглобулинов G, A, M, а также некоторых цитокинов.

**Результаты.** Исходное содержание лейкоцитов в периферической крови у обследованных лиц колебалось от 3,9 до 4,8×10<sup>9</sup>/л (в среднем 4,4±0,11×10<sup>9</sup>/л). Абсолютное содержание лимфоцитов составляло 1,3±0,2×10<sup>9</sup>/л против 1,9±0,09×10<sup>9</sup>/л у здоровых людей (p<0,05). Обращало на себя внимание снижение количественных по-

казателей, прежде всего, Т-клеточного иммунитета, в то же время у 60 % пациентов формирование вторичной иммунной недостаточности носило сочетанный характер и затрагивало как клеточный, так и гуморальный иммунитет. Исходно оказались сниженными фагоцитарная и микробицидная функции нейтрофилов. После терапии деринатом содержание лейкоцитов возросло и составило 5,8±0,12×10<sup>9</sup>/л (у здоровых людей этот показатель в пределах 6,1±0,26×10<sup>9</sup>/л). Из 18 (67 %) больных со сниженными показателями клеточного иммунитета у 12 пациенток наблюдалась положительная динамика показателей Т-звена. При оценке гуморального иммунитета эффект от дерината оказался более стабильным.

**Выводы.** Одним из препаратов, способствующих восстановлению числа лейкоцитов и сниженных иммунологических показателей у больных после комбинированного лечения рака молочной железы, является деринат в курсовой дозе 750 мг.

*М. Я. Шапкина, А. В. Сергеев*

### Перспективы создания лекарственных средств-биокорректоров для использования их в комплексной терапии рака

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

**Введение.** Современное комплексное лечение больных раком часто сопровождается целым рядом токсических осложнений. Хирургическая, радио- и полихимиотерапия индуцируют свободнорадикальные процессы и способствуют истощению защитной антиоксидантной системы (АОС). У пациентов развивается вторичный иммунодефицит в сочетании с иммунодепрессией и оксидантным стрессом, вызванным опухолевым процессом. Поэтому актуально создание лекарственных средств, уменьшающих побочное действие комплексной терапии и способствующих нормализации физиологических функций организма.

**Цель исследования.** Выбор потенциальных компонентов и анализ экспериментально-клинических данных для разработки новых лекарственных средств (биокорректоров) с целью снижения общей токсичности, повышения эффективности противоопухолевой терапии и качества жизни больных.

**Результаты.** В экспериментах *in vivo* β-каротин, препараты ламинарии, каскатол, каскорутол снижали на 30–70 % число хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей, индуцированных цитостатиками (араноза, циклофосфан), усиливали торможение роста опухолей Са0V на 30–60 % по сравнению с контролем, способствовали нормализации ИС. Экстракты солодки и чаги обладали антиоксидантным действием, β-каротин и ликопин — радиопротекторным. В пилотных клинических испытаниях β-каротин при применении в предоперационный период (16 больных раком прямой кишки) способствовал нормализации АОС и ИС, снижению в 6 раз ранних послеоперационных осложнений и в 1,6 раза летальных исходов по сравнению с контролем. 10-дневный курс коррекции каскатолом в предоперационный период больных раком яичников (30 пациенток) снижал на 25 % перекисное окисление липидов, нормализовал АОС. Применение каскатола после радикального лечения больных раком молочной железы (60 пациенток) приводило к нормализации АОС, повышению активности СОД и снижению рецидивов. Препараты чаги повышают эффективность лечения и качество жизни больных III и IV стадиями.

**Выводы.** Все исследуемые препараты нетоксичны и могут быть потенциальной основой создания нового поколения лекарственных средств-биокорректоров для повышения эффективности противораковой терапии.

*И. Ж. Шубина, М. В. Киселевский*

### Апоптоз в популяциях дендритных клеток, генерированных из лимфокин-активированных киллеров

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

При использовании дендритных клеток (ДК) для создания противоопухолевых вакцин важное значение имеет жизнеспособность ДК. На разных стадиях созревания ДК могут подвергаться апоптозу, что снижает их потенциал в реализации антигенпрезентирующих функций. Источником генерации ДК служат в основном мононуклеарные лейкоциты (МНЛ) периферической крови, при этом не более 50 %

культивируемых клеток дифференцируется в зрелые ДК. Есть данные (H. R. Bohnenkamp et al., 2004) о том, что около 40 % исходных МНЛ подвергается программированной клеточной гибели и это может быть причиной невысокого выхода генерируемых ДК. Ранее нами было продемонстрировано, что при получении ДК из культуры МНЛ, активированных ИЛ-2, можно достичь большего пула зрелых ДК.

Проведена оценка апоптотической гибели МНЛ, активированных ИЛ-2 (ЛАК). Изучена жизнеспособность незрелых и зрелых ДК, генерированных из ЛАК. МНЛ выделяли на градиенте фиколлаурографина и инкубировали в пластиковых флаконах 4 ч. Отбирали неприлипшие клетки (лимфоциты), культивировали их в течение 48 ч с ИЛ-2 (1000 ЕД/мл). Из полученных ЛАК генерировали ДК в присутствии ГМ-КСФ, ИЛ-4 и ФНО- $\alpha$  (ДК<sub>ЛАК</sub>). Контролировали иммунофенотипы ЛАК и ДК<sub>ЛАК</sub> на проточном цитофлуориметре. Апоптоз ЛАК, незрелых и зрелых ДК<sub>ЛАК</sub> оценивали с помощью теста по окрашиванию аннексином V (An-V) и пропидий йодидом (PI) на проточном цитофлуориметре.

Имунофенотип ЛАК характеризовался невысокой экспрессией CD3, но при этом значительной экспрессией поверхностных антигенов естественных киллеров CD16, CD56, CD57, молекул адгезии CD58 и незначительной экспрессией маркера CD14 (0–20 %). Окрашивание ЛАК, используемых для генерации ДК<sub>ЛАК</sub> на 2-е сутки культивирования, An-V, PI и одновременно An-V/PI практически не выявило апоптотических или некротизированных клеток. Зрелые ДК<sub>ЛАК</sub> экспрессировали костимулирующие молекулы CD40 (37–40 %), CD80 (34–86 %), CD86 (23–74 %), маркеры ДК CD83 (38–90 %), CD1a (10–40 %) и маркер моноцитов CD14 (0–17 %). При оценке апоптоза незрелых ДК<sub>ЛАК</sub> было отмечено окрашивание An-V+/PI- в 5 % случаев и практически отсутствие An-V-/PI+ и An-V+/PI+. Анализ зрелых ДК<sub>ЛАК</sub> показал отсутствие окрашивания An-V+/PI- и An-V+/PI+, а An-V+/PI+ составило 7 %. Таким образом, при созревании ДК<sub>ЛАК</sub> сохраняют высокую жизнеспособность, а также дают больший выход зрелых ДК по сравнению с пулом, получаемым из МНЛ.

## ДИАГНОСТИКА

*И. Г. Гатауллин, С. В. Петров, А. В. Игуменов, А. И. Тихонов*

### Оптимизация диагностического алгоритма и выбор хирургической тактики у больных с колоректальными ворсинчатыми новообразованиями

*Республиканский клинический онкологический диспансер, Казань*

**Введение.** Ворсинчатые опухоли отличаются особо высокой склонностью к перерождению и рецидивированию. Не решены вопросы достоверного выявления злокачественной трансформации опухоли и единого подхода к ее лечению.

**Цель исследования.** Улучшение результатов диагностики и хирургического лечения больных с колоректальными ворсинчатыми новообразованиями.

**Материал и методы.** Работа основана на анализе результатов клинического обследования и лечения 91 пациента с крупными ворсинчатыми опухолями толстой кишки. Диагностический алгоритм включал фиброколоноскопию с биопсией, трансабдоминальное и трансректальное ультразвуковое исследование, компьютерную томографию. Биопсийный и операционный материалы отправляли на морфологическое исследование, включавшее стандартное гистологическое исследование и иммуногистохимический тест на тканевые биомаркеры. Иммуногистохимические исследования проведены с помощью набора моноклональных антител к маркеру Ki-67, мутантному белку p53, а также к РЭА. Научная новизна работы состоит в том, что впервые предложен и апробирован алгоритм обследования больных с колоректальными ворсинчатыми новообразованиями, включающий комплекс лучевых и иммуноморфологических методов исследования.

**Результаты.** На основании клинических наблюдений установлены дифференциально-диагностические лучевые критерии злокачественной трансформации ворсинчатых опухолей толстой кишки. Показано, что уровень экспрессии тканевых маркеров Ki-67, РЭА, p53 в дополнение к ультразвуковому, эндоскопическим, морфологическим критериям определяет прогноз и показания к выбору адекватного метода лечения. Комплексное предоперационное обследование, включающее эндоректальную эхографию, ультразвуковую колографию, компьютерную томографию и иммуногистохимические методы исследования, позволило снизить число местных рецидивов опухоли с 40,7 до 8,3 %.

**Выводы.** Предложенный алгоритм обследования пациентов способствует более точной оценке распространенности процесса как по протяженности, так и по глубине инвазии в стенку кишки, позволил заподозрить злокачественную трансформацию ворсинчатой опухоли, что обеспечило выполнение радикальных операций, соответствующих объему и характеру поражения.

*Е. Н. Захарова<sup>1</sup>, В. Е. Кузнецова<sup>2</sup>, А. В. Чудинов<sup>2</sup>, А. С. Гриневич<sup>1</sup>, Е. Ю. Лысюк<sup>1</sup>, Д. Ю. Блохин<sup>1</sup>, П. К. Иванов<sup>1</sup>*

### Производные флюорофора Су5 для цитометрического анализа клеточных популяций

<sup>1</sup> *ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*

<sup>2</sup> *Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва*

Одним из современных и наиболее информативных инструментов изучения клеточных популяций является проточная цитофлуориметрия. Этот метод дает возможность анализировать не только состав зафиксированных клеток, но и прижизненную кинетику клеточных популяций в реальном времени.

Поскольку живые интактные клетки, как правило, обладают незначительной автофлуоресценцией, возможности данного метода прямо зависят от свойств флюоресцентных зондов. Большинство специальных зондов получают конъюгированием специфических биоактивных молекул (антител, лектинов, олигонуклеотидов и др.) с активными формами флюорофоров. Основными характеристиками флюорофоров являются: способность к возбуждению флюоресценции монохроматическим светом конструктивно заданной длины волны с эмиссией вторичных квантов в узких спектральных диапазонах; квантовый выход флюоресценции; коэффициент экстинкции; сдвиг Стокса; перекрывание спектров возбуждения и эмиссии. Для возбуждения флюоресценции чаще всего используют аргонный (488 нм), гелий-неоновый (633,5 нм) либо диодный (635–650 нм) лазеры.

В качестве флюорофоров наиболее часто используют флюоресцин изотиоционат (FITC), Р-фикоэритрин (PE), тетраметилродамин (TRITC), аллофикоцианин (APC). Данные зарубежных исследований свидетельствуют об эффективности использования в проточной цитометрии производных цианинового красителя Су5 в виде сукцинимидного эфира, который может связываться с антителами, авидином, ДНК и другими содержащими аминогруппы молекулами. Эти соединения имеют хорошую водорастворимость, нечувствительны к pH, практически не агрегируют при конъюгировании с другими молекулами.

Несмотря на преимущества цианиновых красителей, широкое использование их в проточной цитометрии в нашей стране ограничено в связи с высокой стоимостью. В лаборатории медицинской биотехнологии ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН были проведены сравнительные испытания трех производных цианинового красителя Су5, синтезированных в Институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН в виде сукцинимидных эфиров, обозначенных как Су5 ImD504, Су5 ImD506 и Су5 ImD507. В качестве специфического носителя использовали мышинные моноклональные ан-



титела (МКА) к В-клеточному рецептору лимфоцитов человека (а-CD20, клон 1С0-180, производства НПЦ «МедБиоСпектр», Россия).

В результате проведенных исследований выявлено, что конъюгирование флюоресцентных красителей Cy5 ImD504, Cy5 ImD506 и Cy5 ImD507 с МКА не оказывает существенного влияния на их иммунохимические свойства, а полученные конъюгаты обладают высокими значениями средней интенсивности флюоресценции (MFI), что позволяет использовать их для цитометрического анализа клеточных популяций.

*В. Г. Лихванцева<sup>1</sup>, О. А. Анурова<sup>2</sup>, М. В. Верещагина<sup>1</sup>*

#### **Иммуногистохимические исследования в диагностике беспигментной увеальной меланомы**

<sup>1</sup> ГУ НИИ глазных болезней РАМН, Москва

<sup>2</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

**Введение.** Увеальная меланома (УМ) составляет 80 % всех внутриглазных опухолей. Полиморфность клинического симптомокомплекса определяется чрезвычайной вариабельностью морфологических проявлений этой опухоли. Спектр заболеваний глазного дна, которые приходится дифференцировать с меланомой, включает более 50 нозологических форм. При этом ошибки могут возникать не только на клиническом, но и на гистоморфологическом уровне. Особую трудность представляют амеланотичные УМ.

**Цель исследования.** Раскрыть возможности и диагностическую значимость иммуногистохимических исследований (ИГХ) в диагностике беспигментных УМ.

**Материал и методы.** Проводили ИГХ на 57 парафиновых блоках УМ, среди которых было 16 беспигментных опухолей. В качестве маркеров использовали НМВ-45, S-100, тирозиназу и MITF. Результаты ИГХ оценивали по двум показателям: частоте выявления и уровню экспрессии (выделяли слабую, умеренную и выраженную экспрессию или ее отсутствие). Проводили многофакторный корреляционный анализ. Анализировали степень пигментации, клеточный тип, степень инвазии склеры и сетчатки, протяженность опухоли и ее высоту и другие показатели в зависимости от экспрессии указанных выше маркеров.

**Результаты.** Как в пигментированных, так и в беспигментных УМ уровень экспрессии всех маркеров варьировал от слабого до выраженного. Частота выявления маркеров в беспигментных и пигментированных УМ была примерно одинакова: НМВ-45 — 100 %, S-100 — 100 %, MITF — 100 %, тирозиназы — 93,8 %. Однако выраженность экспрессии тирозиназы и НМВ-45 прямо коррелировала со степенью пигментации УМ ( $p < 0,05$ ), в то время как экспрессия S-100 обратно коррелировала с инвазией опухолью сетчатки и склеры ( $p < 0,001$ ). По мере прорастания опухолью сетчатки и склеры экспрессия S-100 снижалась. Выраженность экспрессии НМВ-45 и MITF не зависела от типа клеточного строения, протяженности, степени инвазии опухолью склеры или сетчатки.

**Выводы.** Таким образом, данные свидетельствуют о возможности применения любого из маркеров (НМВ-45, S-100, MITF и тирозиназы) в дифференциальной диагностике беспигментных УМ. 100%-е выявление НМВ-45, S-100, MITF и 93,8%-е обнаружение тирозиназы подтверждают высокую надежность метода. Низкая экспрессия S-100 в УМ свидетельствует о инфильтративном росте опухоли и требует исключения инвазии сетчатки и склеры.

*Т. Г. Николаева, Д. Ю. Блохин*

#### **Анеуплоидия опухолевых клеток — неблагоприятный прогностический признак течения онкологических заболеваний**

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

**Введение.** Анеуплоидия (некратное гаплоидное изменение содержания ДНК в клетке) возникает в результате появления неустрашимых ошибок репликации ДНК в интерфазе или расхождения хромосом в митозе. В норме появление таких ошибок отслеживается аппаратом генетического самоконтроля клетки в процессе временной остановки митотического цикла в его «сверточных точках». При невозможности ликвидировать возникшее генетическое повреждение системами внутриклеточной репарации ситуация воспринимается как потенциально опасная, что приводит к активации программы гибели (апоптоза) поврежденной клетки. При опухоле-

вой трансформации и последующей прогрессии опухоли достаточно часто (более 50 % исследованных случаев) возникает анеуплоидный генотип опухолевых клеток. Появление клона анеуплоидных клеток свидетельствует о снижении в этих клетках функции генетического самоконтроля в «сверточных точках», что сопряжено с дестабилизацией генома. Снижение функции «сверточных точек» и/или подавление программы клеточной гибели сопровождается повышением устойчивости опухолевых клеток к противоопухолевой терапии, поскольку индуцируемые химиотерапевтическими препаратами или ионизирующим облучением генетические повреждения также «ускользают» от системы самоконтроля и перестают активировать программу клеточной гибели.

**Цель исследования.** Оценка прогностической значимости показателя ДНК-плоидности клеток опухоли для предсказания течения опухолевого процесса в будущем.

**Материал и методы.** Проведены проточно-цитометрические исследования ДНК-плоидности опухолевых клеток человека, составляющих опухоли эпителиального происхождения различных локализаций, распространенности и стадийности процесса. Материалом явились хирургически удаленные в ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН эпителиальные опухоли молочной железы (РМЖ — 270 больных), легкого (РЛ — 96 больных), тканей полости рта и гортани (РПРГ — 206 больных), толстой кишки (РТК — 72 больных). Для большинства случаев прослежена динамика рецидивирования и показатели выживаемости.

**Результаты.** Показано, что при РМЖ диплоидные опухоли (ДО) встречаются в 31 % случаев, анеуплоидные (АО) — в 69 %, причем среди последних 8,8 % составляют многокლოновые опухоли. РПРГ представлен в равной степени ДО и АО (53 и 47 % соответственно). Доля АО при РЛ составила 80 %, а при РТК — 42 %. Для всех исследованных случаев вероятность рецидивирования ДО оказалась в 2–3 раза ниже, а сроки появления рецидивов и метастазов — в 1,5–2 раза дольше, чем для АО. Большинство метастазов в регионарные лимфоузлы исходит из многокლოновых АО, метастазы также являются преимущественно многоклоновыми АО и содержат аналогичную исходной опухоли или новую гипердиплоидную субпопуляцию клеток. Предоперационная лучевая терапия более эффективна у больных с ДО. Выживаемость больных с ДО оказалась в 1,5–2 раза выше. Результаты соответствуют данным литературы.

**Выводы.** Показана высокая прогностическая значимость показателя ДНК-плоидности опухолевых клеток эпителиального происхождения для оценки характера течения опухолевого процесса — длительности безрецидивной и кумулятивной выживаемости, вероятности метастазирования и эффективности проводимого лечения.

*Р. Г. Пегов<sup>1</sup>, А. В. Алясова<sup>1</sup>, В. В. Новиков<sup>2</sup>*

#### **Растворимые антигены CD38 и CD50 при раке легкого**

<sup>1</sup> Нижегородская государственная медицинская академия

<sup>2</sup> Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского

**Цель исследования.** Провести предварительную оценку изменения сыровоточного уровня растворимых антигенов CD38 и CD50 у больных раком легкого в процессе лечения.

**Материал и методы.** Под наблюдением находилось 14 больных раком легкого (РЛ) в возрасте 45–56 лет. У 9 пациентов установлена II стадия заболевания, у 5 — III стадия. В 9 случаях больным проведена пневмонэктомия или расширенная комбинированная пневмонэктомия, в остальных случаях — пробная лапаротомия. Содержание растворимых антигенов CD38 и CD50 определяли разработанными авторами иммуноферментными методами с помощью моноклональных антител до и после проведения операции. Контрольную группу составили 20 здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными.

**Результаты.** Сыровоточное содержание растворимого антигена CD38 (sCD38) у больных раком легкого в среднем было в 1,6 раза ниже, чем в норме, и составило  $116,8 \pm 83,6$  ед./мл ( $p < 0,05$ ). При этом на II стадии РЛ уровень sCD38-антигена имел лишь тенденцию к снижению, а на III стадии падал в 2,2 раза по сравнению с нормой ( $p < 0,02$ ). При плоскоклеточном ороговевающем РЛ был зарегистри-

рован более низкий сывороточный уровень sCD38-антигена, чем при неороговевающем варианте заболевания.

Оперативное вмешательство в объеме пневмонэктомии и расширенной комбинированной пневмонэктомии сопровождалось повышением содержания sCD38-антигена до уровня контрольной группы, что, по-видимому, являлось следствием устранения основной опухолевой массы и снятия дискоординирующего влияния опухоли на иммунную систему. В неоперабельных случаях уровень sCD38-антигена оставался сниженным и в среднем составлял после выполнения пробных лапаротомий  $95,2 \pm 61,2$  ед./мл.

Сывороточная концентрация растворимого CD50 (sCD50) антигена (ISAM-1) сохранялась в пределах нормы, составляя на II стадии  $248,3 \pm 98,2$  ед./мл, а на III стадии —  $270,6 \pm 191,3$  ед./мл. После оперативного вмешательства содержание sCD50-антигена имело тенденцию к повышению.

**Выводы.** Полученные нами предварительные данные свидетельствуют, что рак легкого сопровождается изменением сывороточного содержания растворимого CD38-антигена при отсутствии статистически достоверных изменений в концентрации растворимого CD50-антигена.

Т. П. Рябых<sup>1</sup>, Т. В. Осипова<sup>1</sup>, Е. И. Дементьева<sup>2</sup>,  
Е. Н. Саватеева<sup>2</sup>, Е. В. Коновалова<sup>2, 3</sup>, А. Соколова<sup>1</sup>,  
А. Ю. Рубина<sup>2</sup>, А. Ю. Барышников<sup>1</sup>, А. С. Заседателев<sup>2</sup>

#### Разработка диагностической тест-системы на основе биочипа на простатический специфический антиген (общую и свободную формы)

<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>2</sup> Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

**Цель исследования.** Рак предстательной железы (РПЖ) остается второй по счету причиной смертности у мужчин от онкологических заболеваний. Простатический специфический антиген (ПСА) относится к наиболее эффективным маркерам рака предстательной железы, получившим широкое внедрение в клиническую практику. Применение в диагностике РПЖ двух форм этого антигена — общей и свободной (ПСА<sub>общ.</sub> и ПСА<sub>св.</sub>) значительно увеличивает специфичность ПСА-теста. Технология биочипов открывает новые возможности применения этого маркера для скрининга РПЖ. Целью исследования была разработка тест-системы на основе биочипов для диагностики РПЖ с использованием двух форм ПСА.

**Материал и методы.** Микрочипы на основе гидрогелей с иммобилизованными моноклональными антителами к двум формам ПСА были изготовлены в Центре биочипов ИМБ РАН. Концентрации общей и свободной форм ПСА определяли в сэндвич-варианте иммуноанализа. Флюоресцентные сигналы от вторых антител регистрировали с помощью анализатора биочипов (ИМБ РАН).

**Результаты.** Тест-система на основе биочипа к двум формам ПСА имела удовлетворительные аналитические характеристики. Калибровочные кривые на ПСА<sub>общ.</sub> и ПСА<sub>св.</sub> были хорошо воспроизводимы в различных экспериментах. Коэффициент вариации (КВ) концентраций, соответствующих 50%-му уровню флюоресценции не превышал 4 %. Аналитическая чувствительность тест-системы для ПСА<sub>общ.</sub> составляла 0,1 нг/мл, для ПСА<sub>св.</sub> — 0,19 нг/мл. Тест на «открытие» показал, что отличие измеряемой концентрации от расчетной составляло 8–13 % для ПСА<sub>общ.</sub> Проверка тест-системы на специфичность показала отсутствие перекрестной реактивности с другими опухолеассоциированными антигенами. Тест-система на основе биочипа была апробирована на клиническом материале, включающем сыворотки онкологических больных и здоровых доноров. Было показано, что уровни ПСА<sub>общ.</sub> и ПСА<sub>св.</sub> в сыворотке крови здоровых доноров не превышали общепринятых пороговых уровней — 4 и 1,1 нг/мл соответственно. Коэффициенты корреляции уровней ПСА<sub>общ.</sub> и ПСА<sub>св.</sub> в сыворотке крови больных РПЖ, измеренных на биочипе и в тест-системе Roche Diagnostics, составили соответственно 0,998 и 0,996 ( $p < 0,001$ ).

**Выводы.** Разработан лабораторный вариант новой тест-системы на основе биочипа для одновременного определения двух форм ПСА. В будущем новая тест-система может быть использована для ранней диагностики и скрининга РПЖ в группах высокого риска рака (мужчины старше 50 лет).

М. В. Савостикова

#### Имуноцитохимический метод в оценке некоторых факторов прогноза при раке молочной железы

МНИОИ им. П. А. Герцена, Москва

**Введение.** Достигнуты большие успехи в изучении иммуноцитохимических маркеров, отражающих разные уровни функционирования и биологические свойства опухолевой клетки, особенно при раке молочной железы (РМЖ), дающих возможность определить прогноз течения опухолевого заболевания и предсказать чувствительность новообразования к химиогормональному лечению. Широкое практическое применение нашло иммуноцитохимическое определение рецепторов эстрогенов и прогестерона, экспрессии онкопротеина C-erbB-2 и маркера пролиферативной активности Ki-67 при РМЖ.

**Цель исследования.** Оценить возможности иммуноцитохимического исследования в оценке некоторых прогностических факторов при раке молочной железы.

**Материал и методы.** Проведено 345 иммуноцитохимических исследований у 112 больных раком молочной железы. Для изучения факторов прогноза анализировали экспрессию белка пролиферативной активности Ki-67 у 56 больных, онкопротеина C-erbB-2 — у 65, рецепторы эстрогенов и прогестерона — у 112.

Для визуализации реакции антиген-антитело использовали авидин-биотиновую систему и ДАБ (диаминобензидин). Реакция проводилась на цитологических монослойных мазках, полученных при центрифугировании материала из специальной среды накопления на системе Cytospin-3. В работе использованы моноклональные антитела (фирма DAKO, Дания) к онкопротеину C-erbB-2 (разведение 1:250–1:350), рецепторам эстрогенов (клон 1D5, разведение 1:35), рецепторам прогестерона (клон 636, разведение 1:50) и белку пролиферативной активности Ki-67 (клон MiB-1, разведение 1:50–1:75). Реакция считалась отрицательной при полном отсутствии или экспрессии антигена менее 5 % опухолевых клеток, слабоположительной — при реакции 5–24 % клеток, умеренно выраженной — 25–74 % клеток, выраженной — более 75 % клеток.

**Результаты.** При изучении рецепторного статуса рака молочной железы иммуноцитохимическим методом ER выявлены в 43 % случаев, из них слабоположительная реакция — 42 %, умеренно выраженная — 37 %, выраженная — 21 %. Положительная экспрессия рецепторов прогестерона выявлена в 39 % случаев: выраженная реакция — в 12 %, умеренная — в 32 %, слабая — в 56 %. Экспрессия антигена Ki-67, отражающего пролиферативную активность опухоли, наблюдалась в 86 % случаев рака молочной железы. Степень выраженности пролиферативной активности распределена следующим образом: слабоположительная реакция — 56 %, умеренно выраженная — 33 %, выраженная — 11 %. Онкопротейн C-erbB-2 экспрессировался в 57 % случаев: слабоположительная реакция — 22 %, умеренно выраженная — 38 %, выраженная — 40 %.

**Выводы.** Использование иммуноцитохимического метода позволяет изучить гормональный статус и факторы прогноза при раке молочной железы еще на дооперационном этапе обследования больного.

Д. В. Соколов<sup>1</sup>, И. В. Бульчева<sup>1</sup>, Б. В. Шапков<sup>1</sup>,  
В. В. Соколов<sup>2</sup>, С. Г. Кузьмин<sup>2</sup>

#### Комплексная ранняя диагностика меланомы кожи

<sup>1</sup> Московская городская онкологическая клиническая больница № 62

<sup>2</sup> ГУП МНЦК «Интермедбиофизхим», Москва

В настоящее время улучшение ранней диагностики меланомы кожи связывают с разработкой компьютерных комплексов на основе микродермоскопии и компьютерной обработки цифровых фотографий кожных новообразований, которые повышают уровень ранней диагностики меланомы с 60 до 90 %.

Целью настоящей работы было создание компьютерного комплекса с использованием микродермоскопии (увеличение до 20 раз), ультрамикродермоскопии (увеличение до 150 раз), флюоресцентной дермоскопии и цифровой компьютерной обработки видеоизображений кожной поверхности пациента и ее отдельных участков. Разработана методика осмотра пациента, набора клинического материала с помощью цифровой фотоаппаратуры для получения высококачественных фотоизображений пигментных новообразований кожи, рас-

познавания и архивирования полученного клинического материала для долговременного наблюдения за пациентами из группы риска. Сформирована электронная база данных, включающая цифровые фотографии и гистологические срезы удаленного новообразования в цифровом формате.

С 2004 г. комплексное обследование было проведено 36 пациентам. Использование разработанной методики комплексного обследования позволило поставить диагноз меланомы с чувствительностью 83 % и специфичностью 70 %. Ранее при установлении диагноза меланомы только по данным клинического осмотра чувствительность составляла 33 %, специфичность — 40 %.

Таким образом, разработанный комплекс ранней диагностики меланомы имеет перспективы для использования в онкологической практике.

*И. А. Файнштейн, Е. В. Степанова, И. Н. Соколова,  
А. Ю. Барышников*

**Экспрессия молекулярно-биологических маркеров при раке головки поджелудочной железы**  
ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

**Введение.** Аденокарциномы поджелудочной железы относятся к группе опухолей плохого прогноза с 5-летней выживаемостью менее 3 %. В настоящее время только полная хирургическая резекция рака поджелудочной железы (РПЖЖ) является оптимальным лечением, химио- или лучевая терапия малоэффективна. Актуальность

поисков дополнительных критериев злокачественности опухолей и прогностических факторов несомненна.

**Материал и методы.** В исследование вошло 20 больных (12 мужчин и 8 женщин) аденокарциномой головки поджелудочной железы, проходившие лечение в РОНЦ. Средний возраст больных составил 58±5 лет. Всем больным была выполнена радикальная ГПДР. Проведено иммуногистохимическое исследование маркеров апоптоза (p53, Bcl-2, Вах), ангиогенеза (ТФ, Сох) HER-2/neu и Ki-67.

**Результаты.** Накопление p53 наблюдалось в 35 % случаев РПЖЖ. Экспрессия p53 чаще встречалась при T<sub>4</sub> стадии (60 %), чем при T<sub>3</sub> (35,7 %). Экспрессия маркеров апоптоза Bcl-2 и Вах наблюдалась в 25 и 35 % случаев соответственно. Гиперэкспрессия HER-2/neu (2+ и 3+) обнаружена у 25 % больных РПЖЖ. Отмечалась высокая экспрессия ангиогенных факторов в аденокарциномах ПЖЖ: экспрессия ТФ в 75 % случаев и ЦОГ-2 — в 35 %. Высокая пролиферативная активность опухоли (индекс Ki-67 более 10 %) отмечена в 55 % случаев, низкая — в 45 %. Среди молекулярно-биологических маркеров только экспрессия Bcl-2 показала прогностическую значимость. Ни один из Bcl-2 отрицательных больных не прожил более года, тогда как среди положительных случаев таких больных оказалось 50 %.

**Выводы.** Изучение молекулярно-биологических маркеров при РПЖЖ может помочь определить тактику лечения. Экспрессия Bcl-2 при РПЖЖ, мы предполагаем, может ассоциироваться с неблагоприятным прогнозом течения заболевания.

## ХИМИОТЕРАПИЯ

*М. А. Барышникова, О. Л. Орлова, А. П. Полозкова,  
И. С. Голубева, Н. П. Яворская, Н. А. Оборотова,  
Л. И. Смирнова, С. А. Партолина*

**Разработка лекарственной формы амиронина для перорального применения**  
ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Алкилирующие агенты находят наиболее широкое практическое применение среди различных групп синтетических химических соединений. В соответствии с теорией о целесообразности применения производных аминокислот как потенциальных антиметаболитов аминокислотного обмена злокачественных опухолей в ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина синтезирована субстанция амиронина в виде основания, эфира и кислоты. В биологических экспериментах было показано, что амиронин в виде кислоты наиболее активен и менее токсичен. Амиронин представляет собой D,L-α-амино-β-[n-[n-бис(β-хлорэтил)аминофенокси]фенил]пропионовой кислоты гидрохлорид. Тионинная структура носителя алкилирующей группы придает препарату направленность на щитовидную железу и опухоли, исходящие из нее.

Поскольку амиронин практически не растворим ни в воде, ни в маслах, наиболее рациональной для него является лекарственная форма для перорального применения в виде таблеток. При разработке таблеток амиронина изучены технологические характеристики субстанции амиронина, которые предопределили вид прессования, необходимость введения дополнительных ингредиентов, обеспечивающих возможность процесса таблетирования и высокое (соответствующее требованиям ГФ) качество полученных таблеток (распадаемость, прочность и др.). Для коррекции технологических характеристик субстанции амиронина массу для таблетирования получали методом влажной грануляции. В присутствии влаги хлорэтиламины гидролизуются, поэтому наряду со вспомогательными веществами, необходимыми для улучшения текучести, коррекции насыпной массы и исключения залипаемости на прессующий инструмент, в таблетлируемую массу введен стабилизатор — натрия хлорид. Наибольшую сложность представляла коррекция распадаемости таблеток. Все исследуемые модели таблеток набухали, но не распались. Введение разрыхлителя аэросила позволило получить таблетки, соответствующие требованию ГФ по тесту «распадаемость».

Таким образом, в ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН разработана лекарственная форма труднорастворимого хлорэтиламины амиронина в виде таблеток для перорального применения, которая в настоящее время проходит предклиническое изучение.

*Т. А. Бозуш, А. Б. Равчеева, А. В. Конухова, К. Е. Күзьмина,  
В. Ю. Кирсанов, А. Ю. Барышников*

**Дифференцированная оценка функциональной активности ABC-транспортеров, контролирующих внутриклеточное распределение противоопухолевых препаратов, методом проточной цитофлюориметрии**  
ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

**Введение.** Разработка методов оценки прогностически значимых опухолевых маркеров — одна из проблем, чрезвычайно важных для решения как фундаментальных, так и клинических задач онкологии.

**Цель исследования.** Разработка подхода к дифференцированной оценке функциональной активности ABC-транспортеров, маркеров множественной лекарственной резистентности (MDR), контролирующих накопление MDR-цитостатиков не только в цитоплазме, но и в ядре. Последнее наиболее важно, т. к. является определяющим в реализации специфической активности большинства противоопухолевых препаратов.

**Материал и методы.** Объектом исследования явились культуры клеток разных линий, а также опухолевые клетки, полученные из хирургического биопсийного материала опухолей человека с разным фенотипом MDR. Внутриклеточную флюоресценцию доксорубина (Док) оценивали методом проточной цитофлюориметрии (ПЦФ).

**Результаты.** Впервые описаны разнонаправленные изменения внутриклеточной флюоресценции Док при увеличении его внутриклеточного накопления под воздействием специфических ингибиторов активности ABC-транспортеров (верапамила и генистеина) — увеличение или уменьшение показателя. Учитывая характерное для антрациклинов тушение флюоресценции при связывании с ДНК, сделано заключение, что уменьшение внутриклеточной флюоресценции Док в условиях его повышенного накопления в клетке означает увеличение накопления препарата в ядре, тогда как повышение внутриклеточной флюоресценции Док свидетельствует об увеличении цитоплазматической аккумуляции препарата.

**Выводы.** 1. Методом ПЦФ по характеру (направленности) изменения внутриклеточной флюоресценции Док возможно определить распределение антрациклина между ядром и цитоплазмой, т. е. дифференцированно оценить активность АВС-транспортеров, регулирующих накопление препарата в ядре и цитоплазме. 2. Учитывая, что Док является универсальным субстратом АВС-транспортеров и моделирует «поведение» MDR-цитостатиков в целом, применение разработанного подхода в клинической практике повысит точность индивидуальной оценки фенотипа множественной лекарственной резистентности и прогноза чувствительности к химиотерапии у онкологических больных.

*Исследования поддержаны Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 04-04-49391).*

Д. А. Бодягин<sup>1</sup>, Е. Б. Исакова<sup>1</sup>, В. М. Бухман<sup>1</sup>, М. С. Гинс<sup>2</sup>, В. К. Гинс<sup>2</sup>, П. Ф. Кононков<sup>2</sup>

#### Противоопухолевая активность амарантина

<sup>1</sup> ГУ НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе РАМН, Москва

<sup>2</sup> Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур, Московская область

**Введение.** В ВНИИССОК впервые созданы сорта амаранта овощного назначения, содержащие в листьях биологически активный алкалоид амарантин. В частности, амарантин проявляет протекторную функцию при окислительном стрессе. Он входит в состав ряда биологически активных добавок, приправ и чайных напитков.

**Цель исследования.** Изучение противоопухолевой активности амарантина.

**Материал и методы.** Противоопухолевую активность и общее влияние на организм амарантина изучали на модели роста перевиваемого лимфолейкоза Р388, привитого под кожу взрослым самцам мышей (С<sub>57</sub>В1/6J×DBA/2)F<sub>1</sub>, со средней массой тела 25 г. Раствор (7%) амарантина вводили по 0,5 мл через рот 1 раз в сутки ежедневно со 2-й по 6-й день (день прививки опухоли — 0). Кроме влияния самого амарантина изучали также комбинацию однократного (2-е сутки) низкодозового (50 мг/кг внутривентриально) циклофосфида (ЦФ) с последующим введением амарантина, как указано выше. Противоопухолевую активность оценивали по динамике роста опухоли, рассчитывая массу опухоли на основе определения взаимно перпендикулярных диаметров опухолевого узла. О влиянии на общее состояние организма судили по результатам периодических осмотров и определению массы тела подопытных животных.

**Результаты.** Показано, что перорально вводимый амарантин достоверно тормозит рост солидного варианта лимфолейкоза Р388. При комбинировании однократного низкодозового ЦФ с амарантином наблюдается резкое увеличение противоопухолевого эффекта по сравнению с действием каждого препарата по отдельности. Токсического действия не наблюдалось.

**Выводы.** Полученные данные обосновывают дальнейшее изучение противоопухолевой активности амарантина.

#### И. С. Буренин, З. В. Кузьмина, Н. И. Полянская Сравнительное изучение противоопухолевой активности соединений, полученных из мицелиальных грибов

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

**Введение.** В последние годы в медицине для создания новых лекарственных препаратов все шире используются соединения, обладающие высокой антиоксидантной активностью. В этом отношении особый интерес вызывают каротиноиды грибов, которые благодаря наличию системы сопряженных двойных связей являются мощными антиоксидантами и находят применение для лечения онкологических, сердечно-сосудистых и ряда глазных заболеваний.

Исторически сложилось так, что первоначально как природный антиоксидант из каротиноидов использовали каротин. А в конце XX столетия начались исследования по использованию в медицине другого каротиноида — ликопина как средства, задерживающего развитие рака простаты, а также бесцветных полиенов (БП) — фитонина и фитофлуина (предшественников биосинтеза окрашенных полиенов-каротиноидов). Оказалось, что эти БП также сильные антиоксиданты. Так, фитонин задерживает развитие рака молочной железы.

**Цель исследования.** Сравнительное изучение противоопухолевой активности ликопина, фитонина и фитофлуина, полученных из мицелиальных грибов.

**Материал и методы.** Опыты проведены на мышах-самках линии С<sub>3</sub>H с перевитой опухолью молочной железы и крысах линии АС1 с перевитой аденокарциномой предстательной железы. Животные были разделены на группы по 15 особей в каждой. Опытные животные получали препараты в дозе 0,2, 1 и 2,5 мг/кг в суспензии масла *per os* путем принудительного кормления. 3 группы мышей получали фитонин, другие 3 группы мышей — фитофлуин, а еще 3 группы крыс — ликопин. Животные контрольных групп получали масло в тех же дозах.

**Результаты.** Наиболее значимые результаты были получены в группах, где животные получали ликопин в дозе 2,5 мг/кг массы тела. Процент торможения роста опухоли в этой группе составил 70 %. В группах, где животные получали фитонин и фитофлуин, большие дозы вызывали стимуляцию роста опухоли, тогда как доза в 0,2 мг/кг на 21-е сутки при введении фитонина вызывала торможение роста опухоли на 50 %, а фитофлуин не оказывал противоопухолевого действия.

**Выводы.** Полученные предварительные данные о противоопухолевом действии ликопина открывают новые возможности разработки приоритетных схем лечения гормонозависимых опухолей с использованием новых каротиноидов типа ликопина. Слабовыраженный эффект фитонина и отсутствие его у фитофлуина в отличие от ликопина, несомненно, заставят вернуться к вопросам более глубокого изучения физиологии и биохимии образования этих каротиноидов у грибов, что расширит наши представления о биосинтезе каротиноидов и условиях их образования как сильнейших антиоксидантов.

В. М. Бухман<sup>1</sup>, Е. М. Трещалина<sup>2</sup>, Л. М. Краснополянская<sup>1</sup>, А. И. Усов<sup>3</sup>, В. П. Тихонов<sup>4</sup>, Е. Б. Исакова<sup>1</sup>, Д. А. Бодягин<sup>1</sup>, Л. А. Седякова<sup>2</sup>, А. В. Автономова<sup>1</sup>, И. В. Белицкий<sup>1</sup>, Н. Ю. Соболева<sup>1</sup>

#### Противоопухолевая активность препаратов, приготовленных из базидиальных грибов

<sup>1</sup> ГУ НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе РАМН, Москва

<sup>2</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>3</sup> Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского, Москва

<sup>4</sup> ОАО Завод экологической техники и экопитания «ДИОД», Москва

**Введение.** В народной медицине грибы и полученные из них продукты применяют тысячелетиями. Однако научное изучение продолжается несколько последних десятилетий. Хотя предстоит еще очень большая работа, уже получены экспериментальные и клинические доказательства эффективности применения этих продуктов в медицине и, в частности, в онкологии.

**Цель исследования.** Изучение противоопухолевой активности экстрактов и обогащенных полисахаридами фракций, полученных из ряда культивируемых базидиомицетов.

**Материалы и методы.** Противоопухолевую активность и общее влияние на организм изучаемых препаратов оценивали *in vivo* на моделях роста ряда перевиваемых опухолей мышей. В большинстве опытов препараты из грибов вводили через рот курсами различной продолжительности. В ряде экспериментов для облегчения проявления препаратами противоопухолевой активности использовали антисупрессорную обработку мышей путем однократного введения низкодозового (50–100 мг/кг внутривентриально) циклофосфида (ЦФ). О противоопухолевой активности судили по общепринятым в экспериментальной онкологии параметрам, о влиянии на организм — по результатам периодических осмотров, определению массы тела подопытных животных, результатам вскрытия.

**Результаты.** Выявлена противоопухолевая активность экстрактов и обогащенных полисахаридами фракций из таких культивируемых грибов, как *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinaceus*, *Lentium edodes*. Токсического действия не наблюдалось.

**Выводы.** Полученные данные обосновывают дальнейшее изучение противоопухолевой активности экстрактов и обогащенных полисахаридами фракций базидиомицетов.

П. М. Бычковский<sup>1</sup>, Т. Л. Юркинович<sup>1</sup>, С. А. Беляев<sup>1</sup>,  
Ф. Н. Капуцкий<sup>1</sup>, А. В. Ваккер<sup>2</sup>, И. В. Залуцкий<sup>2</sup>,  
Э. А. Жаврид<sup>2</sup>

### Применение полимерной формы цисплатина для локальной химиотерапии различных новообразований головы и шеи

<sup>1</sup> НИИ физико-химических проблем Белгосуниверситета, Минск

<sup>2</sup> НИИ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, Минск

Предупреждение развития рецидивов и продолжения роста опухоли после ее условно-радикального и нерадикального удаления — одна из наименее разработанных проблем онкологии. Особую актуальность этот вопрос приобретает при лечении больных с местнораспространенными и рецидивными опухолями головы и шеи, у которых в связи с анатомо-топографическими условиями локализации новообразования радикальное хирургическое лечение крайне затруднено, а порой и невозможно. Одним из перспективных способов профилактики рецидивов является локальное применение некоторых цитостатических лекарств, вносимых в ложе удаленной опухоли во время операционного вмешательства.

В лаборатории лекарственных средств на основе модифицированных полисахаридов НИИ ФХП БГУ (Минск, Беларусь) была получена полимерная форма противоопухолевого препарата цисплатина (ЦП) на основе отечественного рассасывающегося полимера монокарбоксилцеллюлозы (МКЦ), разрешенного в Республике Беларусь для имплантации в биологические ткани человеческого организма. Полимерная форма цисплатина (ПФЦП) представляет собой смесь цисплатина с МКЦ при соотношении компонентов (вес/%) : цисплатин 3–5, МКЦ 95–97.

Исследованиями *in vivo* и *in vitro* установлено, что ПФЦП обладает цитостатическим эффектом, который по своей активности не уступает нативному ЦП и при этом не оказывает выраженного токсического действия.

Клинические испытания ПФЦП были проведены в НИИ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (Минск, Беларусь) на 45 больных с различными новообразованиями головы и шеи. В результате местного применения ПФЦП после первичных (17) и рецидивных (28) нерадикальных удалений различной локализации на голове и шее в настоящее время здоровы 23 (51 %) человека, а рецидивы возникли у 22 (49 %) пациентов. Сравнение полученных результатов в исследуемой группе больных с результатами обычного комбинированного лечения (контрольная группа) больных раком решетчатого лабиринта, верхней челюсти и лиц с большими новообразованиями шеи свидетельствуют об эффективности местного применения пластинок ПФЦП. При использовании ПФЦП частота рецидивов уменьшилась в среднем на 25–40 % в зависимости от локализации опухоли.

П. М. Бычковский<sup>1</sup>, Т. Л. Юркинович<sup>1</sup>, Ф. Н. Капуцкий<sup>1</sup>,  
С. А. Беляев<sup>1</sup>, Е. А. Короткевич<sup>2</sup>, Э. А. Жаврид<sup>2</sup>,  
С. В. Шелез<sup>2</sup>, А. Ф. Смянович<sup>3</sup>

### Получение новой лекарственной формы цисплатина и ее медико-биологические свойства

<sup>1</sup> НИИ физико-химических проблем Белгосуниверситета, Минск

<sup>2</sup> НИИ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, Минск

<sup>3</sup> НИИ неврологии, нейрохирургии и физиотерапии МЗ РБ, Минск

Низкая эффективность современных комплексных схем лечения низкодифференцированных глиом головного мозга ставит вопрос о разработке и использовании принципиально новых подходов в ее терапии и является одной из самых актуальных проблем нейрохирургии и онкологии.

В работе исследован процесс иммобилизации на биодеградируемом полимере — монокарбоксилцеллюлоза (МКЦ) цисплатина (ЦП) — одного из наиболее эффективных противоопухолевых препаратов для системной и внутриартериальной химиотерапии злокачественных новообразований.

Установлено, что процесс сорбции ЦП МКЦ из водных растворов описывается аналогом уравнения Ленгмюра, определены константы сорбционного равновесия, предельной сорбционной емкости, коэффициенты межфазного равновесия, рассчитаны значения

свободной энергии сорбции. Методом ИК-спектроскопии показано отсутствие химического взаимодействия между ЦП и МКЦ.

В условиях *in vitro* и *in vivo* было показано, что полимерная форма ЦП (ПФЦП) не обладает выраженным нейротоксическим действием на интактную ткань головного мозга как в месте имплантации, так и на отдалении и полностью сохраняет цитостатические свойства исходного ЦП. Клинические испытания ПФЦП были проведены на 37 больных с низкодифференцированными глиомами головного мозга (pT<sub>2</sub>M<sub>0</sub>G<sub>3-4</sub> стадия опухоли), включающие в себя хирургическое удаление опухоли в пределах неизменной мозговой ткани с имплантацией на стенки послеоперационной раны ПФЦП с последующей лучевой терапией. Медиана выживаемости больных, которым была проведена локальная химиотерапия ПФЦП, составила 433 дня, что в 2 раза превышало этот показатель при стандартном комбинированном лечении (214 дней). При применении ПФЦП 7 больных пережило 1 год после операции, а в контрольной группе — только 2 больных.

Полученные данные доказывают возможность эффективного применения ПФЦП в лечении больных злокачественными новообразованиями головного мозга.

Л. Б. Горбачева<sup>1</sup>, А. Г. Тихомиров<sup>1</sup>, Л. Ю. Дедерер<sup>1</sup>,  
Н. А. Иванова<sup>2</sup>, О. С. Ерофеева<sup>2</sup>, И. А. Ефименко<sup>2</sup>

### Некоторые аспекты механизма действия комплекса палладия с циклическими аминами (морфозол)

<sup>1</sup> Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва

<sup>2</sup> Институт общей и неорганической химии им. Н. С. Курнакова РАН, Москва

В последнее время появляются единичные сообщения о цитотоксичности различных комплексов палладия, который, как известно, относится к металлам платиновой группы. В ИОНХ им. Н. С. Курнакова РАН был синтезирован ацидокомплекс палладия II (Pd II), обладающий высокой противоопухолевой активностью в отношении широкого спектра экспериментальных опухолей [1]. В данной работе изучали некоторые аспекты механизма действия Pd II.

Межнитевые шивки определяли флюориметрическим методом по Бренту. Взаимодействие Pd II с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями изучали спектрофотометрически, используя Spекord M40. Внутриклеточное распределение в клетках опухолей Акатол, лейкозов P388 и L1210 определяли методом дифференциального центрифугирования гомогенатов этих опухолей с последующим микроопределением палладия атомно-абсорбционным методом на спектрофотометре «Перкин Элмер», модель 2100 с электротермической атомизацией. Синтез ДНК в клетках опухолей исследовали по включению 2-С<sup>14</sup>-тимидина в ДНК.

Было показано, что Pd II *in vitro* не взаимодействует с фосфатами, но образует комплексы с пуриновыми и, в меньшей степени, с пиримидиновыми основаниями в составе ДНК, что приводит к появлению межнитевых шивок. В присутствии Pd II наблюдается зависимость от дозы уменьшение доступности ДНК для актиномина D, который интеркалирует в двойную спираль ДНК между соседними G–C-парами. Pd II преимущественно связывается с гуанином и аденином. Можно предположить, что Pd II, так же как и производные цис-платины, взаимодействует с N7-атомами этих оснований.

Было изучено внутриклеточное распределение палладия в опытах на мышах с опухолями Акатол и P388. Установлено преимущественное накопление палладия во фракции цитозоля при внутривенном введении морфозола. Обнаружено глубокое и устойчивое торможение синтеза ДНК в клетках лейкоза L1210, менее выраженное в клетках Акатол.

Таким образом, морфозол подавляет синтез ДНК, взаимодействуя с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями в составе ДНК. Поскольку морфозол отличается высокой реакционной способностью, вероятно, для этого препарата существуют и другие мишени, такие как ДНК-полимеразы и различные белковые факторы.

### Литература

1. Трещалин И. Д. // Рос. биотер. журн. — 2002. — Т. 1, № 2. — С. 145–147.

Н. П. Ермакова, Л. М. Михайлова, А. И. Трифонов,  
И. Ю. Малышев, Н. Ю. Кульбачевская

### Влияние терафталла и бинарной каталитической системы «терафталл + аскорбиновая кислота» на артериальное давление

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

**Цель исследования.** Изучение влияния терафталла (ТФ) и бинарной каталитической системы «терафталл + аскорбиновая кислота» («ТФ+АК») на артериальное давление (АД) животных.

**Материал и методы.** Исследовано 60 здоровых неинbredных крыс-самцов массой 200–250 г. ТФ вводили животным однократно внутривенно в дозе, равной МПД (максимально переносимой дозе) (30 мг/кг) и  $1/10$  МПД (3 мг/кг). Бинарную каталитическую систему «ТФ+АК» вводили в дозе, равной МПД (20+44 мг/кг) и  $1/10$  МПД (2+4,4 мг/кг). Контрольным крысам вводили физиологический раствор натрия хлорида. АД измеряли непрямым бескровным методом на хвостовой артерии крыс с помощью установки Physiograph DMR-4F (Narco Bio-Systems, США) по методике Е. В. Манухиной, И. Ю. Малышева, В. Д. Микояна и соавт. (1996). Перед измерением давления животное помещалось на столик с подогревом Rat Holder Temperature Control Unit MK IV (Narco Bio-Systems, США). Через 15–20 мин на хвост прикрепляли датчик для измерения давления и манжетку. Далее следовала стандартная процедура измерения АД: до введения препарата и после (через 2 и 10 мин, 1, 3 и 24 ч).

**Результаты.** Введение животным ТФ в дозе 30 мг/кг приводило к резкому снижению АД со 115 до 90–80 мм рт. ст., которое не восстанавливалось в течение 24 ч. У 10 % крыс отмечали снижение АД ниже 80 мм рт. ст. (коллапс) и их гибель. При введении ТФ в дозе 3 мг/кг АД снижалось в среднем на 15 мм рт. ст. и восстанавливалось через 24 ч. При введении крысам одного ТФ в дозе 20 мг/кг наблюдали такое же снижение АД, что и при дозе 30 мг/кг. При введении АК через час после ТФ давление повышалось на 7 мм рт. ст., но через сутки не достигало исходного уровня. При введении крысам ТФ в дозе 2 мг/кг АД резко повышалось с 110 до 130 мм рт. ст. и сохранялось в течение часа после введения препарата. При введении АК через час после ТФ давление возвращалось к исходному значению. У контрольных животных после введения физиологического раствора натрия хлорида АД оставалось в пределах физиологической нормы для крыс (при непрямом бескровном методе измерения — 110–118 мм рт. ст.).

**Выводы.** ТФ и бинарная каталитическая система «ТФ+АК» оказывают дозозависимое действие на АД крыс, вызывая у них в МПД быстрое, выраженное и стойкое понижение АД, а в низких дозах ( $1/10$  МПД) — менее выраженный гипотензивный эффект. ТФ в дозе ниже  $1/10$  МПД вызывает гипертензивное действие. АК частично восстанавливает АД животных после применения ТФ.

О. С. Жукова<sup>1</sup>, Н. А. Санина<sup>2</sup>, Л. В. Фетисова<sup>1</sup>,  
Г. К. Герасимова<sup>1</sup>

### Цитотоксический эффект нитрозильных комплексов железа на опухолевые клетки человека *in vitro*

<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>2</sup> Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка

Открытие монооксида азота (NO) — эндогенного соединения, выполняющего функции посредника в межклеточных взаимодействиях и цитотоксического эффектора иммунологической защиты организма, стимулировало в последние годы интенсивные исследования по поиску соединений, генерирующих NO, с целью создания противоопухолевых препаратов нового поколения. Серонитрозильные комплексы железа являются новым перспективным и неизученным классом неорганических NO-доноров. Эти соединения содержат одновременно 2 фрагмента (NO и RS) и, являясь структурными аналогами природных источников NO, могут рассматриваться в качестве нового класса соединений, обладающих противоопухолевым действием.

В настоящей работе изучен цитотоксический эффект ряда серонитрозильных комплексов железа на клетки карциномы яичника человека линии SCOV<sub>3</sub>. Соединение считали активным, если его концентрация, ингибирующая рост клеток на 50 % (ИК<sub>50</sub>), выше 100 мкМ.

Кристаллические серонитрозильные комплексы железа [Fe<sub>2</sub>(SR)<sub>2</sub>(NO)<sub>4</sub>] синтезированы по методикам, впервые разработанным в ИПХФ РАН. Соединения, содержащие в качестве лигандов азазетероциклические тиолы — тиопроизводные имидазола, триазола, тетразола, обладали высоким координационным потенциалом. Из всех 8 изученных комплексов активность проявили тетранитрозильный сульфидный, фенольный и имидазольный комплексы железа (ИК<sub>50</sub>=50 мкМ). Учитывая оригинальность структуры и механизма действия, активные нитрозильные комплексы железа рекомендуются для изучения на противоопухолевую активность *in vivo*.

Е. В. Игнатьева, А. П. Полозкова, О. Л. Орлова,  
М. А. Кортава, И. В. Ярцева, Л. Г. Гатинская,  
Н. А. Оборотова

### Химико-фармацевтическая стандартизация лиофилизированной термозависимой липосомальной лекарственной формы доксорубина (ТЛЛФД-лио)

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

**Введение.** В ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН разрабатывается новая лекарственная форма доксорубина, которая представляет собой длительно циркулирующие термочувствительные липосомы, способные захватывать достаточное количество препарата и при нагревании до температуры 42±1 °С высвободить его в окружающую среду.

**Цель исследования** — первичная химико-фармацевтическая стандартизация ТЛЛФД-лио.

**Материал и методы.** Для получения липосом использовали дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC) и дистеароилфосфатидилхолин (DSPC) фирмы Lipoid, взятые в соотношении 9:1. Для стерической стабилизации липосом использовали PEG-2000-DSPE, в качестве крипротектора — 2% раствор лактозы. Свежеприготовленную липосомальную дисперсию доксорубина помещали во флаконы вместимостью 10 мл и лиофилизировали.

**Результаты.** Стандартизация ТЛЛФД-лио проводилась по следующим основным критериям: описание, подлинность, средняя масса содержимого флакона, размер липосомальных везикул, pH, количественное определение доксорубина. Подлинность препарата подтверждали электронным спектром поглощения, характерным для доксорубина. Определяли средний диаметр везикул в проводящем лазерном луче с помощью фотонного корреляционного анализатора Submicron Particle Sizer Nicomp-380 (США), величину pH — потенциометрически. Содержание доксорубина во флаконе (мг) определяли спектрофотометрически при длине волны 252±2 нм, используя рабочий стандартный образец. В качестве раствора сравнения использовали смесь липидов соответствующей концентрации. Основные показатели качества ТЛЛФД-лио приведены в табл. 1. На основании проведенных исследований разработан проект ФСП.

Таблица 1. Основные показатели качества ТЛЛФД-лио

Описание	Подлинность	Средняя масса содержимого флакона, мг	pH	Размер везикул, нм	Содержание доксорубина в 1 флаконе, мг
Лиофилизированная сухая пористая масса красновато-розового цвета	ЭСП должен иметь максимумы при длине волны 232, 252, 288 и 498 нм	20–27	7,0–7,6	Не более 250	0,34–0,46

В. А. Каминский<sup>1,2</sup>, А. А. Фильченков<sup>3</sup>, М. П. Завелевич<sup>3</sup>,  
Н. М. Храновская<sup>4</sup>, Р. С. Стойка<sup>1,2</sup>

### Сравнительный анализ апоптозинуцирующего действия алкалоидов чистотела на клетки лимфобластного лейкоза человека

<sup>1</sup> Институт биологии клетки НАН Украины, Львов

<sup>2</sup> Львовский национальный университет, Львов

<sup>3</sup> Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии НАН Украины, Киев

<sup>4</sup> Институт онкологии АМН Украины, Киев

Препараты на основе производных алкалоидов чистотела используются в противоопухолевой химиотерапии. Путем модифика-

ции тиофосфамидом смеси алкалоидов чистотела на Украине получен оригинальный препарат амитозин. Вместе с тем противоопухолевая активность отдельных алкалоидов, входящих в состав этого препарата, исследована недостаточно. Нами изучено действие индивидуальных алкалоидов чистотела (сангвинарина, хелеритрина, копизина и хелидонина) на индукцию апоптоза в перевиваемых клетках линии МТ-4 острого лимфобластного лейкоза человека в сопоставлении с их ДНК-интеркалирующей способностью. Уровень апоптоза и распределение клеток по фазам клеточного цикла определяли с помощью проточной цитофлуориметрии. Интеркалирующую способность алкалоидов оценивали по их влиянию на термоденатурацию ДНК опухолевых клеток. Двунитевые разрывы ДНК анализировали с помощью метода ДНК-комет, а образование олигонуклеосомных фрагментов — электрофорезом фрагментированной ДНК апоптотических клеток в геле агарозы.

Среди исследованных алкалоидов наиболее токсичным для клеток МТ-4 оказался сангвинарин, тогда как хелидонин и хелеритрин обладали умеренным цитотоксичным действием, а копизин — слабым. Вместе с тем наиболее мощным индуктором апоптоза, судя по содержанию гиподиплоидных клеток и образованию олигонуклеосомных фрагментов ДНК, был хелидонин, который является единственным из 4 исследованных алкалоидов, непосредственно не взаимодействующих с ДНК. Из исследуемых алкалоидов только хелидонин вызывал дозозависимый блок клеток в фазе  $G_2/M$ . Максимальное формирование ДНК-комет наблюдалось через 6 ч после внесения сангвинарина или хелеритрина, обладающих наиболее выраженной ДНК-интеркалирующей способностью. В присутствии хелидонина ДНК-кометы клеток МТ-4 обнаруживались через 24 ч.

Таким образом, по характеру индукции апоптоза и специфическому эффекту в фазе  $G_2/M$  именно действие хелидонина ближе всего к действию амитозина, причем эффект данного алкалоида не связан с его интеркаляцией в структуру ДНК.

С. М. Киселев<sup>1</sup>, Н. М. Перетолчина<sup>1</sup>, А. В. Клеев<sup>2</sup>,  
А. М. Козлов<sup>1</sup>

### Противоопухолевая и антиметастатическая активность рулида в режиме монотерапии и в сочетании сисплатином

<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>2</sup> ФГУ Уральский научно-практический центр радиационной медицины, Челябинск

**Введение.** Препараты, обладающие антибактериальной активностью, часто применяются в онкологической практике для лечения ригидных инфекционных заболеваний, сопутствующих развитию онкопатологии. Одним из наиболее известных препаратов является рулид (рокситромицин) — антибиотик ряда макролидов. В настоящее время получены новые экспериментальные данные, показывающие, что рулид наряду с антибактериальной активностью проявляет активность в отношении некоторых биологических процессов, задействованных в механизме развития опухоли и ее метастазирования.

**Цель исследования.** Изучение противоопухолевой и антиметастатической активности рулида в отношении карциномы легкого Льюиса в режиме монотерапии и в сочетании с сисплатином.

**Материал и методы.** Исследование выполнено на мышах BDF<sub>1</sub> с подкожно трансплантированной карциномой легкого Льюиса. Рулид в режиме монотерапии вводили перорально 2 раза в сутки в дозе 25 мг/кг в течение 10 дней, начиная со 2-х суток после трансплантации опухоли. При комбинированном лечении рулид применяли по вышеуказанной схеме, сисплатин вводили внутривенно однократно в дозе 5 мг/кг на 2-е сутки (схема 1) или на 7-е сутки (схема 2) после перевивки опухоли. Противоопухолевый эффект оценивали по торможению роста опухоли (ТРО, %), антиметастатический эффект — по массе легких, пораженной метастазами, при забое животных контрольных и терапевтических групп в конце опыта (на 28-е сутки).

**Результаты.** Рулид в режиме монотерапии проявлял пролонгированный противоопухолевый эффект (ТРО после окончания лечения составило 56 %, на момент забоя — 30 %). Выявлено антиметастатическое действие препарата, торможение роста метастазов (ТМ) составило 51 %. Экспериментальные данные, полученные *in vivo*, коррелируют с результатами, ранее полученными нами *in vitro* при изучении антиинвазивной активности препарата в отношении

клеток исследуемой опухоли. При комбинированном применении рулида и сисплатина отмечено потенцирование противоопухолевого эффекта. Так, ТРО у животных, получавших комбинированное лечение по схеме 1, на момент окончания курса терапии составило 78 %, тогда как ТРО у группы животных, получавших только сисплатин, — 48 % (по объему опухоли). ТРО у животных на момент забоя в указанных группах составляло 34 и 5 % соответственно. При этом средняя масса легких с метастазами в группе комбинированного лечения была на 50 % меньше аналогичного показателя в группе с сисплатином. В режиме отсроченного введения сисплатина (схема 2) при комбинированной терапии с антибиотиком также показано увеличение противоопухолевой активности. ТРО у животных, получавших комбинированное лечение по схеме 2, на момент окончания курса терапии составило 57 %, тогда как в группе животных, получавших только сисплатин, эффект отсутствовал. ТРО у животных на момент забоя составляло 26 и +5 % соответственно. Эффект по ТМ в указанной схеме также прослеживается и составляет 29 %.

**Выводы.** Выявлена противоопухолевая и антиметастатическая активность рулида в отношении карциномы легкого Льюиса в режиме монотерапии и в сочетании с сисплатином. Полученные экспериментальные данные характеризуют рулид как перспективный компонент комплексной терапии злокачественных новообразований.

### Н. П. Коновалова, В. Д. Сень, Т. Е. Сашенкова Синергизм противоопухолевого действия сисплатина и комплексов платины (IV) с аминитроксилированными радикалами

Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка

**Введение.** Ранее нами было показано, что введение нитроксилированных радикалов в структуру противоопухолевых цитостатиков приводит к значительному изменению их фармакологических свойств: уменьшается общая токсичность, снижается степень серьезных побочных эффектов, повышается противоопухолевая активность.

**Цель исследования.** Синтез и изучение противоопухолевой активности комплексов платины (IV) с аминитроксилированными радикалами. Учитывая, что в современной химиотерапии опухолей используются комбинации препаратов различной структуры и механизма действия, в работе был исследован эффект комбинированного применения сисплатина и его нитроксилированных производных.

**Материал и методы.** Эксперименты проводили на лейкомии P388, перевиваемой по стандартной методике. В опытах использовали низкую, неэффективную дозу сисплатина, составляющую  $1/10$  ЛД<sub>50</sub>. Нитроксилированные производные также вводили в низких, неэффективных дозах.

**Результаты.** Были синтезированы и исследованы три аминитроксилированных комплекса платины различной структуры. При их комбинации с сисплатином отмечен значительный синергетический эффект. При индивидуальном введении сисплатина и платинитроксилированных комплексов в низких дозах излечения животных не наблюдалось.

При комбинированном применении выживали от 70 до 100 % животных. По-видимому, степень синергизма зависела от структуры нитроксилированного фрагмента.

Аналогичные эксперименты были проведены с комбинацией карбоплатина и одного из платинитроксилированных комплексов. В этих случаях наблюдали значительное увеличение средней продолжительности жизни животных. Так, при введении одного карбоплатина этот индекс составлял 20 %, а в сочетании с аминитроксилированным комплексом — 350 %.

**Выводы.** Полученные экспериментальные данные указывают на значительный синергизм действия препаратов платиновой группы и платинитроксилированных комплексов. Учитывая, что препараты платиновой группы проявляют многочисленные побочные эффекты, возможность резко снизить дозы сисплатина и карбоплатина при сохранении противоопухолевого эффекта представляется весьма перспективной в практическом плане.

О. И. Коняева, Л. М. Михайлова, И. Б. Меркулова,  
Н. П. Ермакова, Е. Л. Членова, Н. Ю. Кульбачевская,  
Т. В. Абрамова

**Влияние терафталя на токсичность доксорубина**  
ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

**Цель исследования.** Изучение влияния терафала (ТФ) на токсичность доксорубина (Dox). Задачей исследования стало изучение возможных защитных (протекторных) свойств ТФ в терапии Dox-индуцированной кардиомиопатии и влияния ТФ на общетоксическое действие Dox.

**Материал и методы.** Исследования проведены на 60 здоровых неинbredных крысах-самцах массой 200–250 г. Для изучения потенциальных кардиопротекторных свойств ТФ моделировали Dox-индуцированную кардиотоксичность: 3-кратное введение Dox крысам с интервалом 72 ч (1 раз в 3 дня). Указанный режим введения Dox экспериментально моделирует кардиотоксичность препарата (F. Villani et al., 1986; S. E. Gelperina et al., 2002). Dox вводили внутривенно в разовой дозе 2,5 мг/кг (суммарная доза 7,5 мг/кг, равная МПД). ТФ применяли за 30 мин до Dox 3-кратно внутривенно в разовой дозе 0,8 и 2,5 мг/кг (суммарные дозы 2,5 и 7,5 мг/кг, равные  $1/10$  и  $1/3$  МПД соответственно). Параллельно 2 группам животных вводили только ТФ или Dox в той же дозе, что и при совместном применении.

**Результаты.** ТФ не оказывает влияния на количественную токсичность Dox, не защищает органы и ткани (сердце, печень, почки, периферическая кровь) животных от токсических повреждений, вызванных Dox, вызывая сходные с действием одного Dox морфофункциональные проявления токсичности. Однако ТФ усиливает гематологическую токсичность Dox, увеличивая в 1,5 раза лейкопению, уменьшая в 1,3–2,5 раза количество эритроцитов, тромбоцитов и уровень гемоглобина по сравнению с введением одного Dox. ТФ не оказывает существенного влияния на кардиотоксическое действие Dox. У животных, получавших Dox на фоне ТФ, так же как и при применении только Dox, наблюдали увеличение интервалов QT и ST на 27–26 и 33–36 % соответственно и систолического показателя на 38–34 % по сравнению с фоновыми и контрольными показателями. Изменения ЭКГ крыс сопровождаются умеренными очаговыми и дистрофическими изменениями мышечных волокон миокарда, которые сочетаются с немногочисленными микроочагами лимфомакрофагальной инфильтрации в интерстициальной ткани сердца животных.

**Выводы.** Установлено, что ТФ влияет на общетоксические свойства Dox и не обладает кардиопротекторными свойствами, т. е. не нормализует функции сердца при его поражении Dox и не ускоряет восстановления морфофункциональных изменений в сердечной мышце при Dox-индуцированной кардиомиопатии у животных.

*Исследование поддержано Правительством Москвы.*

*А. В. Ланцова, Н. А. Оборотова, Н. М. Перетолчина, А. П. Полозкова, З. С. Шпрах, А. Ю. Барышников*

### **Биофармацевтическая стандартизация стерически стабилизированной липосомальной лекарственной формы БХНМ**

*ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*

**Введение.** БХНМ — 1,3-бис(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевина, воспроизведенная субстанция кармустина (BiCNU), синтезирована в лаборатории антиметаболитов Института органического синтеза Уральского отделения РАН. Лекарственная форма препарата в виде лиофилизата для приготовления раствора для инъекций по 0,02 г разработана в РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН.

**Цель и задачи.** Цель исследования — разработать оптимальный состав стерически стабилизированной липосомальной лекарственной формы БХНМ для повышения биодоступности препарата и его избирательного накопления в опухолях. Основная задача — определение биофармацевтических характеристик липосом БХНМ.

**Материал и методы.** Для создания препарата в липосомах с пролонгированным временем циркуляции в кровяном русле в состав липидной оболочки включили PEG-5000 DSPE. Малые однослойные пэгиллированные липосомы БХНМ получали гидратацией липидной пленки, образующейся после упаривания в вакууме спиртовых растворов липидов, с последующей экструзией липосомальной дисперсии через поликарбонатные мембраны. Количественное определение содержания препарата в липосомах проводили методом прямой УФ-спектрофотометрии. Продукт перекисного окисления липидов — малоновый диальдегид (МДА) определяли пробой с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) на липосомах БХНМ, в липид-

ную оболочку которых включен антиоксидант  $\alpha$ -токоферол. Определение противоопухолевой активности новой липосомальной лекарственной формы БХНМ проводили на экспериментальной модели опухоли мышей — лейкозе L1210.

**Результаты.** Получены стерически стабилизированные липосомы БХНМ, размер которых составил  $240 \pm 23$  нм, количество МДА —  $4,71 \pm 0,21$  нмоль/мл. БХНМ в липосомальной форме при однократном внутривенном введении в дозе 40 и 45 мг/кг проявила максимальный терапевтический эффект, при этом излечение животных составило 100 %. БХНМ в дозе 50 мг/кг вызывала гибель 100 % мышей от токсичности. При сравнительном исследовании со стандартной лиофилизированной лекарственной формой БХНМ в диапазоне доз от 30 до 50 мг/кг излечения животных не наблюдали, отмечали лишь увеличение продолжительности их жизни от 74 до 117 %.

**Выводы.** 1. Получена новая лекарственная форма БХНМ в виде стерически стабилизированных липосом со средним диаметром  $240 \pm 23$  нм, количеством МДА  $4,71 \pm 0,21$  нмоль/мл. 2. БХНМ в липосомальной лекарственной форме проявила высокий противоопухолевый эффект, при однократном внутривенном введении в дозе 40 и 45 мг/кг достигнуто 100%-е излечение животных.

*Н. А. Лесная<sup>1</sup>, Е. М. Трещалина<sup>1</sup>, А. А. Кладиев<sup>2</sup>, В. И. Романенко<sup>1</sup>*

### **Проспидин в комбинации с аранозой и цисплатином**

*<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*

*<sup>2</sup> Биотехнологическая компания ТНК, Москва*

**Введение.** В предварительных исследованиях нами было показано, что применение комбинации проспидин + араноза или араноза + цисплатин значительно эффективнее, чем использование препаратов в монорежиме. Эффективность комбинации араноза + цисплатин подтверждена при лечении больных меланомой. Сочетание трех препаратов представляется перспективным в плане улучшения результатов химиотерапевтического лечения.

**Цель исследования.** Изучение эффективности и переносимости комбинации проспидин + цисплатин + араноза на мышцах с перевиваемой меланомой.

**Материал и методы.** Работа выполнена на 50 мышцах-самках BDF<sub>1</sub> с относительно устойчивой к химиотерапии развившейся внутримышечно меланомой В16 объемом около 0,4 см<sup>3</sup>. Препараты вводили внутривенно 3-кратно ежедневно в МПД и  $3/4$  МПД. В комбинации препараты вводили одновременно последовательно в тех же дозах и режиме. Интервал между комбинантами 7–10 мин. Группа контроля — мыши без специфического воздействия. В каждой группе по 7 мышей. Терапевтический эффект оценивали по ТРО (%) и УПЖ (%). О переносимости судили по гибели и состоянию внутренних органов мышей при аутопсии. Данные подвергали статистической обработке по стандартному методу Стьюдента в модификации Р. Б. Стрелкова.

**Результаты.** Показано, что араноза и цисплатин в МПД не действовали на рост развившейся внутримышечно меланомы В16, ТРО 29 % ( $p > 0,05$ ). После лечения цисплатином или аранозой продолжительность жизни мышей практически не изменялась, УПЖ 22 % ( $p > 0,05$ ). Проспидин в МПД достоверно ингибировал рост опухоли на 35–47 % ( $p < 0,05$ ). Эффект регистрировался в течение 3-й недели после отмены препарата, что является отличительной чертой проспидина. После лечения проспидином продолжительность жизни мышей достоверно возросла, УПЖ — 47 % ( $p < 0,05$ ). В группе проспидин + цисплатин + араноза независимо от примененной дозы препаратов получено ингибирование роста опухоли на 65–75 % (суммарный эффект). Этот эффект регистрировали с 3-х по 25-е сутки после окончания лечения, т. е. в течение 3 нед., и он был достоверно выше, чем в группе проспидина ( $p < 0,05$ ). При тройной комбинации также независимо от примененной дозы препаратов получено существенное УПЖ — 71–82 %, которое было достоверно выше, чем в группе проспидина ( $p < 0,05$ ). Переносимость комбинированного лечения была удовлетворительной.

**Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что комбинация проспидин + цисплатин + араноза при одновременном применении 3-дневным курсом по терапевтическому действию высокоэффективна и хорошо переносима даже при применении макси-



мальных доз препаратов. Комбинация перспективна для клинической апробации, в т. ч. при диссеминированной меланоме.

*К. А. Лопатина, Т. Г. Разина, Н. В. Шилова, А. М. Гурьев*  
**Растительные полисахариды в экспериментальной онкологии**

*ГУ НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН, Томск*

Имеются данные литературы о разнонаправленности фармакологического действия полисахаридов природного происхождения на развитие опухолевого процесса. В связи с этим цель нашей работы — оценить влияние различных полисахаридных фракций аира болотного и ольхи клейкой на развитие карциномы легких Льюиса (LLC) у мышей.

Эксперименты проводились на мышах-самках линии C<sub>57</sub>Bl/6. Полисахаридный комплекс (ПСК) корневищ аира болотного, его фракции (водорастворимые полисахариды — ВРПС), пектиновые вещества (ПВ), гемицеллюлозы (ГЦ), а также ВРПС и ПВ из различных частей ольхи клейкой вводили мышам в дозе 10 мг/кг внутривентриально и 100, 200 мг/кг перорально ежедневно в течение 12 дней, контрольные животные получали соответствующие растворители. Эффективность лечения оценивали по изменению массы основного опухолевого узла, частоте возникновения метастазов в легких, их количеству и площади.

ПСК корневищ аира болотного, его отдельная фракция гемицеллюлозы и водорастворимые полисахариды листьев ольхи клейкой были неактивны в отношении карциномы легких Льюиса у мышей с LLC. При внутривентриальном назначении ВРПС корневищ аира болотного и пероральном применении ВРПС коры ольхи клейкой масса опухоли у животных уменьшалась по сравнению с группой контроля. Увеличение дозы ВРПС зрелых соплодий ольхи приводило к усилению противоопухолевого действия, что выразилось в снижении массы основного опухолевого узла и показателей, характеризующих процесс диссеминации LLC. Лечение мышей ПВ листьев и зрелых соплодий ольхи клейкой приводило к уменьшению количества метастазов и площади метастатического поражения легочной ткани. При назначении экспериментальным животным ПСК шрота и ВРПС корневищ аира болотного увеличивалась площадь метастазов в легких мышей с LLC, а при использовании ПВ этого растения наблюдалось увеличение их количества относительно значений у нелеченных животных. Введение мышам с LLC ВРПС зрелых соплодий ольхи и ПВ корневищ аира приводило к значительной стимуляции процессов метастазирования опухоли по сравнению с контролем.

Полисахариды из растительного сырья в зависимости от химического состава, дозы и пути введения, части растения, из которой они извлечены, способа выделения могут разнонаправленно влиять на развитие LLC, ингибируя или стимулируя рост опухоли. Перспективным для дальнейшего углубленного исследования с целью использования в клинической практике представляется изучение ВРПС коры ольхи клейкой и корневищ аира болотного с применением современных методик.

*И. Б. Меркулова, И. С. Голубева, Н. П. Яворская, Т. В. Абрамова*

**Гистологическая оценка влияния амиронина и его производных на щитовидную железу крыс**

*ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*

**Введение.** Препарат амиронин синтезирован в РОНЦ РАМН и Санкт-Петербургском ТУ и представляет собой хлорэтиламинное производное тиронина — основного компонента гормонов щитовидной железы тироксина и трийодтиронина. Амиронин показал высокую противоопухолевую активность на перевиваемых опухолях. Учитывая структуру амиронина и его производных — основания амиронина и этилового эфира амиронина, предполагается их тропность к щитовидной железе и опухолям щитовидной железы.

**Цель исследования.** Сравнительное гистологическое исследование щитовидной железы крыс при пероральном применении амиронина и его производных.

**Материал и методы.** Проведено сравнительное гистологическое исследование щитовидной железы 30 неинбредных крыс-самок на 1-е и 5-е сутки после 5-кратного ежедневного перорального применения субстанций препаратов в виде водной суспензии на основе 1%

крахмала, а также щитовидной железы 10 контрольных крыс после перорального применения водной суспензии на основе 1% крахмала. Амиронин вводили в разовой дозе 180 мг/кг, основание амиронина — в разовой дозе 200 мг/кг, этиловый эфир амиронина — в разовой дозе 100 мг/кг в эквивалентных терапевтических дозах.

**Результаты.** Через 1 сут после прекращения перорального применения амиронина и основания амиронина в щитовидной железе крыс отмечали отек стромы, увеличение числа крупных тиреоидных фолликулов, содержащих коллоид, уплотнение фолликулярного эпителия (снижение функциональной активности). У части крыс в щитовидной железе, кроме того, отмечены дистрофические изменения тироцитов и деструкция фолликулов. После применения этилового эфира амиронина деструктивные изменения в щитовидной железе крыс были более выраженными — вплоть до полной десквамации тиреоидного эпителия в большей части фолликулов. Через 5 сут после прекращения перорального введения амиронина и основания амиронина в щитовидной железе крыс наряду с остаточными деструктивными изменениями отмечались признаки регенерации и активации структурных элементов; после применения этилового эфира амиронина признаки восстановления были незначительными.

**Выводы.** Амиронин и основание амиронина при 5-кратном пероральном применении в эквивалентных терапевтических дозах оказывают умеренное, быстро обратимое повреждающее действие на щитовидную железу крыс. Этиловый эфир амиронина имеет более выраженный и стойкий повреждающий эффект.

*М. В. Нехорошев<sup>1</sup>, В. А. Гринцов<sup>2</sup>, Г. Н. Апрышко<sup>2</sup>*  
**Перспективы создания противоопухолевых препаратов из оболочников, культивируемых в Черном море**

<sup>1</sup> *Институт биологии южных морей НАН Украины, Севастополь*

<sup>2</sup> *ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*

В Институте биологии южных морей Национальной академии наук Украины, г. Севастополь, отработана методика успешного культивирования черноморского вида оболочников *Botryllus schlosseri* на коллекторах в Крыму. С 1 га марихозияства (1000 коллекторов) можно собрать годовой урожай сырого веса оболочников *Botryllus schlosseri*, равный 5 тоннам. В лаборатории марикультуры и прикладной океанологии ведутся работы по выделению из культивируемого *Botryllus schlosseri* биологически активных препаратов. В частности, определены содержание и фракционный состав каротиноидов. В 100 г сырого веса *Botryllus schlosseri* содержится 12,0±2,0 мг каротиноидов, что значительно выше, чем в традиционном морском сырье для их выделения — бурых водорослях. Основными пигментами являются аллоксантин, фукоксантин и фукоксантинол. Для 2 последних, по данным литературы, показана высокая антипролиферативная активность по отношению к клеткам рака предстательной железы человека РС-3 и способность индуцировать апоптоз, активируя каспазу-3.

На сегодняшний день оболочники являются наиболее перспективными организмами для получения противоопухолевых препаратов морского происхождения. Так, из оболочника *Ecteinascidia turbinata* выделен обладающий цитостатическим и проапоптотическим действием избирательно ингибирующий транскрипцию ДНК алкалоид Ecteinascidin-743 (ET-743, Trabectedin, Yondelis), для которого по результатам II фазы клинических испытаний показана активность при резистентных к химиотерапии саркоме мягких тканей и раке яичника. В настоящее время находится в III фазе клинических испытаний. Для получения необходимого количества препарата *Ecteinascidia turbinata* специально культивируют у берегов Испании. Перспективный циклический пептид Aplidine, выделенный из средиземноморского оболочника *Aplidium albicans*, являющийся мощным индуктором апоптоза и обладающий антиангиогенными свойствами, проходит II фазу клинических испытаний.

В лаборатории также начаты работы по выделению из культивируемого в Черном море *Botryllus schlosseri* препаратов Ecteinascidin-743 и Aplidine или близких им аналогов.

Институт биологии южных морей заинтересован в сотрудничестве с учреждениями, проводящими биологические испытания и разработку противоопухолевых лекарств.

Ю. Л. Осип<sup>1</sup>, Р. С. Стойка<sup>2</sup>, М. Д. Луцук<sup>2</sup>

**Сравнительный анализ интеркалирующих свойств индивидуальных алкалоидов чистотела (*Chelidonium majus* L.)**

<sup>1</sup> Волынский государственный университет им. Леси Украинки, Луцк

<sup>2</sup> Институт биологии клетки НАН Украины, Львов

Проведен сравнительный анализ интеркалирующих свойств 5 индивидуальных алкалоидов чистотела — хелидонина (Х), сангвинарина (С), хелеритрина (ХЕ), коптизина (К) и берберина (Б). В качестве эталона сравнения применяли известный интеркалятор актиномицин D. В анализах использовали препарат ДНК из семян лосося («Сигма», США). Связывание лигандов с ДНК определяли с помощью трех методов: 1) уменьшение величины светопоглощения алкалоида (для сангвинарина и хелеритрина при 325 нм, для коптизина при 345 нм, для берберина при 340 нм) при связывании алкалоида с ДНК вследствие сдвига максимума поглощения; 2) изменение температуры плавления ДНК в присутствии алкалоида, определяемого по кривым термоденатурации; 3) конкурентное вытеснение метилового зеленого из его комплекса с ДНК интеркалирующим лигандом. С целью количественной оценки интеркалирующих свойств лиганда изучали его взаимодействие с ДНК при различных концентрациях лиганда и из полученных кривых определяли концентрацию полумаксимального эффекта.

Установлено, что исследованные алкалоиды чистотела, за исключением Х, проявляют свойства интеркаляторов. Они повышали температуру плавления ДНК, наиболее значительное повышение наблюдалось в присутствии ХЕ и С (на 16–17 °С при концентрации алкалоида 10 мкг/мл). Полумаксимальный эффект повышения температуры плавления ДНК достигался при следующих концентрациях алкалоидов (мкг/мл): С — 4,4, ХЕ — 4,6, К — 5,4, Б — 5,7, актиномицин D — 5,7. Результаты теста на вытеснение метилового зеленого из ДНК комплекса дали аналогичный результат. Концентрации алкалоидов, обеспечивающие полумаксимальный эффект в данном тесте, составляли: С — 9, ХЕ — 15,5, К — 34, Б — 41,5, актиномицин D — 42 мкг/мл. Количественно результаты отличались от таковых, полученных по температуре плавления, однако порядок размещения алкалоидов по ослаблению интеркалирующих свойств был идентичным. По эффективности интеркалирования актиномицин D соответствовал Б. Независимыми исследованиями установлено, что между цитотоксичностью и антипролиферативной активностью алкалоидов чистотела и их интеркалирующими свойствами существует тесная корреляция.

Ю. И. Патютко<sup>1</sup>, Э. И. Гальперин<sup>3</sup>, И. В. Сагайдак<sup>1</sup>, Г. К. Герасимова<sup>1</sup>, Г. Н. Ворожцов<sup>2</sup>, Т. Г. Дюжева<sup>3</sup>, А. Н. Поляков<sup>1</sup>

**Результаты I фазы клинических испытаний по применению каталитической системы «терафтал + аскорбиновая кислота» при селективно-окклюзионном введении в сосуды печени для лечения больных со злокачественными опухолями печени**

<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>2</sup> ФГУП ГНЦ НИОПИК, Москва

<sup>3</sup> Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова

Бинарная каталитическая система «терафтал + аскорбиновая кислота» («ТФ+АК») — новое средство, предназначенное для химиотерапии злокачественных новообразований, проходит клинические испытания при селективно-окклюзионном введении в печеночную артерию для лечения больных с метастатическими опухолями печени.

В I фазу исследования применения каталитической системы селективно-окклюзионным методом включено 10 больных. Из них у 8 выявлены метастазы колоректального рака, по 1 больному метастазы в печени рака желудка и рака предстательной железы. Все больные ранее получали без положительного эффекта многократные курсы химио- или гормонотерапии (больной раком простаты с метастазами в печени).

Селективно-окклюзионное введение каталитической системы «ТФ+АК» осуществлялось по следующей методике: под комбинированным наркозом выполнялась лапаротомия, производилась мо-

билизация печени. Во время полной сосудистой изоляции печени путем наложения турникета на печеночно-двенадцатиперстную связку и печеночные вены (или нижнюю полую вену выше и ниже впадения печеночных вен) производилась катетеризация собственно печеночной артерии, введение и 5-минутная экспозиция 0,05% раствора ТФ. Сразу после снятия турникетов вводился 0,1% раствор АК через ранее установленный катетер в печеночной артерии.

4 пациентам выполнено циторедуктивное хирургическое удаление метастазов на стороне большего поражения с воздействием на остающиеся определяемые очаги каталитической терапией. 1 пациенту по поводу метастазов рака толстой кишки выполнены паллиативная правосторонняя гемигепатэктомия, удаление имплантационного метастаза по париетальной брюшине, еще 1 пациенту по поводу метастазов рака толстой кишки — паллиативная бисегментэктомия 2–3-го сегмента печени, 1 пациентке также по поводу метастазов рака толстой кишки — паллиативная резекция 5-го сегмента печени. Кроме того, 1 пациентке с метастазами рака желудка выполнены резекция печени в объеме бисегментэктомии II–III, а также лимфодиссекция печеночно-двенадцатиперстной связки, удаление имплантационного метастаза из послеоперационной раны.

Основной технической проблемой являлось выделение печеночных вен и надпеченочного отдела нижней полой вены, особенно при расположении массивных опухолевых узлов в верхнецентральных отделах печени (VIII, IVA сегменты). У 1 пациентки вмешательство на печени было повторным, что затруднило мобилизацию печени из-за массивного спаечного процесса. Еще у 1 пациентки выраженный рубцово-спаечный процесс в брюшной полости также объяснялся произведенным ранее оперативным вмешательством в объеме дистальной субтотальной резекции желудка.

Задачами I фазы являются отработка доз и режимов введения препаратов, оценка переносимости, определение максимально переносимой дозы и дозолимитирующей токсичности. В процессе лечения проведена эскалация доз компонентов каталитической системы по модифицированному методу Фибоначчи до 450 % стартовой дозы.

2 больным введено 0,9 мг/м<sup>2</sup> ТФ и 1,98 мг/м<sup>2</sup> АК. С учетом отсутствия серьезных токсических проявлений (у 1 больного отмечена гепатоспленомегалия, усиление активности печеночных ферментов без клинических признаков, что было расценено как проявление токсического гепатита), было решено увеличить дозу вводимых препаратов.

3 больным введенная доза ТФ составила 1,32 мг/м<sup>2</sup>, аскорбиновой кислоты — 2,96 мг/м<sup>2</sup>. У 1 больного отмечено осложнение в виде абсцесса в области резекции печени, который был дренирован (больному была выполнена паллиативная правосторонняя гемигепатэктомия).

Еще 2 больным доза ТФ была увеличена до 1,49 мг/м<sup>2</sup>, АК — до 3,33 мг/м<sup>2</sup>. У 1 пациентки в послеоперационном периоде отмечены признаки холангита, гипербилирубинемия, которые были купированы консервативно. У другой пациентки после введения каталитической системы отмечены стойкая артериальная гипотензия, кожная сыпь, что было расценено как анафилактический шок. В связи с этим следующим пациентам доза препаратов была снижена: 2 пациента получили ТФ в дозе 1,32 мг/м<sup>2</sup>, АК — 2,96 мг/м<sup>2</sup>. Еще 1 пациентка получила каталитическую терапию с использованием ТФ (0,9 мг/м<sup>2</sup>) и АК (1,98 мг/м<sup>2</sup>). Токсических и побочных эффектов, так же как и осложнений после операции, у этих пациентов не отмечено. У всех пациентов наблюдалась временная артериальная гипотензия в момент пережатия нижней полой вены и введения ТФ, что не расценивалось как осложнение. Побочными эффектами, лимитирующим дальнейшую эскалацию дозы ТФ, явились развитие холангита в одном случае и стойкая артериальная гипотензия — в другом.

Выявлен противоопухолевый эффект каталитической терапии в виде длительных стабилизаций процесса. В настоящее время в группе больных колоректальным раком живы и продолжают наблюдаться 4 больных. Продолжительность жизни этих больных составляет 17 мес. без прогрессирования (доза ТФ 0,9 мг/м<sup>2</sup>); 10 мес., из них 7 мес. без прогрессирования (доза ТФ 1,32 мг/м<sup>2</sup>); 9 мес., из них 6 мес. без прогрессирования (доза ТФ 1,32 мг/м<sup>2</sup>) и 5 мес., из них 2 мес. без прогрессирования (доза ТФ 1,49 мг/м<sup>2</sup>). Судьба 1 пациентки неизвестна (доза ТФ 0,9 мг/м<sup>2</sup>). Умерло 3 больных в сроки 8 мес. (доза ТФ 0,9 мг/м<sup>2</sup>), 4 мес. (доза ТФ 1,32 мг/м<sup>2</sup>) и 3 мес.

(доза ТФ 1,32 мг/м<sup>2</sup>) после проведения каталитической терапии. Больная раком желудка прожила 3 мес. (доза ТФ 1,49 мг/м<sup>2</sup>) после проведения каталитической терапии. Больной раком простаты с метастазами в печени жив 4 мес. без прогрессирования (доза ТФ 1,32 мг/м<sup>2</sup>). Зависимости продолжительности эффекта в виде стабилизации от дозы препаратов выявлено не было.

На основании полученных результатов для II фазы клинических испытаний селективно-окклюзионного метода применения каталитической системы «ТФ+АК» рекомендована доза ТФ 1,32 мг/м<sup>2</sup> и АК 2,96 мг/м<sup>2</sup>.

*Т. А. Раевская, С. А. Гончарова, Н. П. Коновалова*  
**Перспективы использования доноров оксида азота для повышения чувствительности лекарственно-устойчивых опухолей**

*Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка*

**Цель исследования.** Изучить влияние доноров оксида азота из класса органических нитратов на чувствительность лекарственно-резистентных опухолей к противоопухолевым цитостатикам в эксперименте *in vivo*.

**Материал и методы.** Исследование проводилось на животных с лекарственно-устойчивыми штаммами лейкемии P388, обладающими фенотипом и генотипом МЛУ. Использовались доноры оксида азота 3,3-бис(нитроксиметил)оксетан (NMO), нитроксиэтиламин никотиновой кислоты (никорандил), 3-нитроксиметил,3-гидрокси-метил-оксетан (К-27). Критериями оценки эффекта служили показатель увеличения продолжительности жизни животных по сравнению с контролем (ILS) и количество выживших животных.

**Результаты.** Эффект увеличения чувствительности МЛУ-опухолей P388/руб и P388/вкр был получен при применении циклофосфана (ЦФ) и цисплатина (сРт) в низких дозах (1/2, 1/3, 1/4, и 1/8 терапевтической дозы) в комбинации с NMO. Наблюдалось значительное увеличение ILS животных (в 1,5–5,3 раза) и появление в группах излеченных животных. Использование, например, сРт в низкой дозе 1 мг/кг увеличивает ILS животных на 91 %, комбинация NMO с той же дозой сРт увеличивает ILS до 248 %, и 33 % животных при этом выживают. Увеличение в комбинации дозы NMO с 1 до 9,5 мг/кг приводит к повышению эффекта, сам препарат NMO в использованных дозах не обладает антилейкемической активностью.

Применение сРт в уменьшенных в 2–4 раза по сравнению с терапевтической дозой в сочетании с никорандилом давало эффект, сравнимый с таковым терапевтической дозы сРт. Например, 1 мг/кг сРт (1/4 терапевтической дозы) увеличивает ILS животных с МЛУ-опухолями P388/руб и P388/вкр более чем в 2 раза, тогда как монотерапия сРт в дозе 2 мг/кг дает значительно меньший эффект.

Использование в комбинации с низкой дозой ЦФ (30 мг/кг) одновременно 2 доноров NMO и К-27 было более эффективно (ILS 253 %), чем комбинация каждого донора с ЦФ (ILS 170 и 112 % соответственно).

**Выводы.** Таким образом, результаты настоящего исследования показывают, что применение доноров оксида азота в комбинации с цитостатиками в низких неэффективных дозах увеличивает химиотерапевтическую чувствительность резистентных опухолей.

*С. Г. Романова<sup>1</sup>, Н. В. Плявник<sup>1</sup>, М. А. Маслов<sup>1</sup>,  
 А. А. Штиль<sup>2</sup>, Г. А. Серебренникова<sup>1</sup>*

**Бесфосфорные глицеролипиды алкильного типа — новый класс противоопухолевых соединений**

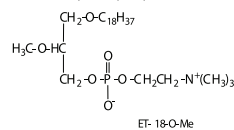
<sup>1</sup> МИТХТ им. М. В. Ломоносова, Москва

<sup>2</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

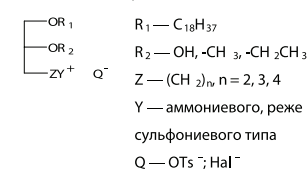
Алкильные глицеролипиды (липиды с простой эфирной связью) — перспективный класс противоопухолевых агентов благодаря их способности вызывать преимущественную гибель опухолевых клеток и отсутствию мутагенного эффекта. Фосфорсодержащие алкильные глицеролипиды эдельфозин, пирофозин, мелтифозин и другие используются для лечения, вместе с тем синтез подобных соединений достаточно сложен и включает работу с токсичными фосфорсодержащими группами.

Нами разработан синтез бесфосфорных производных алкильных глицеролипидов (аналогов эдельфозина; см. схему) с алифатическими и гетероциклическими основаниями в структуре полярного до-

Эдельфозин (1-октадецил-2-метил-гас-глицеро-3-фосфолин)



Общая структурная формула бесфосфорных катионных глицеролипидов алкильного типа



мена и модифицирован спейсерный участок в положении С3 глицеринового остова. Получены серии новых катионных глицеролипидов алкильного типа, отличающихся длиной спейсерной группы между гидрофобной и гидрофильной частью молекулы и содержащих полярные «головки», представленные остатками N,N-димил-этанолamina и N,N,N<sub>1</sub>N<sub>1</sub>-тетраметилэтилендиамина, а также различными гетероциклическими основаниями — пиридином, морфолином, гистидином и их производными. Преимущества синтеза бесфосфорных алкильных глицеролипидов — относительная простота, сокращение стадий и уменьшение времени лимитирующей стадии (алкилирование положения С2 глицеринового скелета). Отмечены высокие выходы конечных соединений. Исследована цитотоксичность новых бесфосфорных глицеролипидов алкильного типа на клеточных линиях MCF7 (рак молочной железы), HCT116 (рак толстой кишки), K562 (лейкоз). Отобраны соединения, цитотоксическая активность которых не уступает эдельфозину. Эти препараты не обладают гемолитическим свойством в концентрациях, вызывающих гибель опухолевых клеток.

Таким образом, разработана стратегия синтеза оригинальных бесфосфорных глицеролипидов и установлены требования к их структуре, позволяющие получать активные противоопухолевые соединения. Анализируются механизмы гибели клеток при действии новых бесфосфорных глицеролипидов.

*Т. А. Сидорова<sup>1</sup>, И. С. Северина<sup>2</sup>, А. Ю. Щеголев<sup>2</sup>,  
 Г. К. Герасимова<sup>1</sup>, О. Л. Калия<sup>3</sup>, Г. Н. Ворожцов<sup>3</sup>*

**Роль растворимой гуанилатциклазы в цитопротекторных свойствах терафтала (ТФ) и эндогенных металлопорфиринов**

<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>2</sup> Институт биологической и медицинской химии

им. В. Н. Ореховича РАМН, Москва

<sup>3</sup> ФГУП ГНЦ НИОПИК, Москва

**Введение.** Растворимая гуанилатциклаза (рГЦ) осуществляет синтез в клетках цГМФ, вторичного мессенджера сигнального пути рГЦ/цГМФ. Установлено, что в некоторых линиях опухолевых клеток рГЦ/цГМФ сигнальный путь обеспечивает их выживаемость при воздействии ряда стимулов, активирующих программу апоптоза. Однако неизвестно, вовлечен ли рГЦ/цГМФ сигнальный путь в защиту опухолевых клеток от цитотоксического действия антрациклиновых антибиотиков. Ранее нами было показано, что ТФ (окта-4,5-карбокситфаллоцианин кобальта) и эндогенные металлопорфирины (гемин, цинк-протопорфирин) снижают цитотоксичность некоторых антрациклиновых антибиотиков.

**Цель исследования.** Оценить участие рГЦ/цГМФ сигнального пути в защите опухолевой клетки от токсического воздействия антрациклиновых антибиотиков.

**Материал и методы.** Культура клеток эритролейкоза человека линии K562 с эндогенной экспрессией растворимой гуанилатциклазы служила моделью для исследования роли рГЦ в цитотоксических и цитопротекторных эффектах изучаемых препаратов. Препараты: ТФ, доксорубин, даунорубин; специфические активаторы: нитропруссид натрия, (SNP), YC-1 и ингибиторы (LY83583, ODQ) рГЦ. Цитотоксическую активность исследуемых веществ и их комбинаций оценивали с помощью МТТ-метода. Базальный и индуцированный препаратами уровень экспрессии мРНК рГЦ оценивали методом РТ-ПЦР.

**Результаты.** Установлено, что в присутствии SNP (10 мкМ), активатора рГЦ, наблюдается снижение цитотоксической активности антрациклиновых антибиотиков относительно клеток K562. Принимая во внимание тот факт, что эти антибиотики являются ингибито-

рами каталитической активности рГЦ, можно предположить, что выявленная способность нитропрусида снижать цитотоксическую активность антрациклиновых антибиотиков связана с активацией рГЦ и ее сигнального пути в клетках K562. Однако оказалось, что прединкубация лейкозных клеток с ингибитором рГЦ LY83583 также приводит к снижению цитотоксической активности антрациклиновых антибиотиков. Такой сценарий развития событий в клетке возможен только в том случае, если в присутствии ингибитора рГЦ индуцируется экспрессия гена рГЦ, что можно оценить по уровню мРНК этого фермента, в результате чего происходит дополнительный синтез новых молекул белка и восстанавливается динамическое равновесие внутри клетки молекулярных форм белка-фермента, нарушенное ингибитором. Показано также, что в условиях угнетения рГЦ с помощью LY83583 снижается способность ТФ и эндогенных металлопорфиринов (гемина и цинк-протопорфирина) защищать клетки от цитотоксичности антрациклиновых антибиотиков. Таким образом, угнетение рГЦ снижает цитопротекторные свойства ТФ и эндогенных металлопорфиринов.

**Выводы.** Механизм гибели опухолевых клеток при действии антрациклиновых антибиотиков реализуется через сигнальный путь, контролируемый рГЦ. Комбинирование антрациклиновых антибиотиков с препаратами, влияющими на функциональную активность рГЦ, может снизить их цитотоксическую активность.

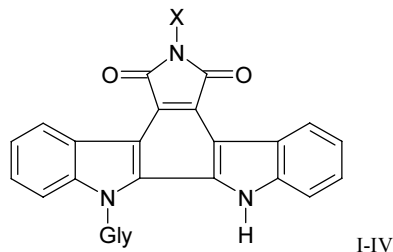
*Работа выполнена при финансовой поддержке НТП «Разработка и внедрение в медицинскую практику новых методов диагностики и лечения онкологических и других заболеваний» и гранта РФФИ № 050448577.*

З. С. Смирнова, И. Ю. Кубасова, Л. М. Борисова,  
М. П. Киселева, Т. Д. Миникер, И. Л. Плихтяк,  
Л. В. Эктова, С. Я. Стельник

### Изучение связи структуры и противоопухолевой активности в ряду N-гликозидов, производных индоло[2,3-а]карбазола

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

**Введение.** Данная работа является продолжением исследований по синтезу и изучению производных N-гликозидов индола. Ранее было показано, что соединения этого класса могут обладать иммуномодулирующей, антибактериальной и противоопухолевой активностью. Представлялось интересным изучить влияние заместителя в имидном цикле или структуры углеводного остатка на противоопухолевую активность. С этой целью были синтезированы следующие соединения: гликозиды I и II, различающиеся заместителем у имидного азота (X = H (I), X = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(4-morpholino) (II)), и гликозиды III и IV, имеющие в своем составе различные углеводные фрагменты (Gly = β-D-Gal (III) и Gly = α-L-Ara (IV)), и исследованы их противоопухолевые свойства на перевиваемых опухолях животных.



**Материал и методы.** Сравнительное исследование противоопухолевой активности гликозидов I и II проводили на лимфоидной лейкемии P388, а гликозидов III и IV — на эпидермоидной карциноме легкого LLC. Гликозиды растворяли в ДМСО (10% раствор) и физиологическом растворе и вводили внутривенно ежедневно в течение 5 дней в широком диапазоне доз от 10 до 125 мг/кг. Критериями эффективности служили увеличение продолжительности жизни опытных животных по сравнению с контрольными (УПЖ, %) и торможение роста опухоли (ТРО, %).

**Результаты.** Показано, что гликозид II проявил более высокий противоопухолевый эффект на P388 (УПЖ 119 %) по сравнению с гликозидом I (УПЖ 85 %). Терапевтические дозы для гликозидов составляли 100 (II) и 50 (I) мг/кг и для гликозида II выявлена LD<sub>33</sub>, которая равна 125 мг/кг. Высокая и равная эффективность была вы-

явлена для гликозидов III и IV на LLC — максимальное ТРО составляло 90 % в разных терапевтических дозах — 125 и 50 мг/кг соответственно.

**Выводы.** Гликозиды I и II с разными заместителями у имидного азота различаются по силе противоопухолевого эффекта и терапевтической дозе на P388. Изменение структуры углеводного фрагмента приводит к равному противоопухолевому эффекту, но в разных терапевтических дозах гликозидов III и IV на LLC. Из полученных данных следует, что на противоопухолевый эффект изученных соединений влияют не только заместители в агликоне, но и природа гликозидного остатка.

В. И. Соловьев, Е. Н. Семкина

### Миостофоран в паллиативном лечении больных с метастатическим поражением головного мозга

Областной онкологический клинический диспансер, Смоленск

**Введение.** В последние 2 десятилетия все большее значение в лечении злокачественных поражений головного мозга помимо лучевого воздействия приобретает химиотерапия. Хорошо зарекомендовал себя в данном случае миостофоран.

**Цель исследования.** Оценить эффективность применения миостофорана в улучшении качества жизни онкологических больных с метастатическим поражением головного мозга.

**Материал и методы.** В 2004 г. паллиативную химиотерапию миостофораном получили 12 человек с метастазами в головной мозг. Возраст больных варьировал от 32 до 74 лет, средний возраст составил 55,8 лет. Мужчин было 66,6 %, женщин — 33,4 %. Распределение пациентов в зависимости от локализации первичного очага выглядело следующим образом: рак легкого — 41,7 %, молочной железы — 25,0 %, почки — 8,3 %, тела матки — 8,3 % и меланома кожи — 16,7 %. Качество жизни (КЖ) оценивалось по трем критериям: степени физической активности по шкале ECOG, выраженности болевого синдрома и продолжительности ночного сна. Удовлетворительное КЖ при первичном обращении было отмечено лишь у каждого четвертого пациента. Миостофоран использовался в режиме монотерапии в дозе 100 мг/м<sup>2</sup>, в 1, 8 и 15-й день с последующим перерывом в течение 5 нед. Количество курсов варьировало от 1 до 5.

**Результаты.** Эффективность химиотерапии оценивали по выраженности ответа опухоли на лечение или ремиссии. Наиболее эффективным лечение было при раке молочной железы и легкого. Общая эффективность лечения составила 33,3 %. Проведение паллиативной химиотерапии способствовало улучшению качества жизни пациентов в 65 % случаев, что проявлялось уменьшением или исчезновением неврологической симптоматики, снижением интенсивности хронического болевого синдрома и увеличением степени продолжительности ночного сна, что позволило отказаться от приема наркотических и сильнодействующих анальгетиков и седативных препаратов. Средняя продолжительность жизни больных от начала проведения лечения по поводу метастазов в головной мозг по рассматриваемым группам была следующей: рак легкого — 6,8 мес., рак молочной железы — 10,2 мес., меланома — 2,7 мес., рак почки — 24,3 мес., рак тела матки — 9,4 мес. Средняя продолжительность жизни составила 10,7 мес.

**Выводы.** Таким образом, в, казалось бы, безнадежных случаях паллиативная химиотерапия миостофораном позволяет не только улучшить качество жизни у 65 % пациентов, но и увеличить среднюю продолжительность жизни с 4 мес. при симптоматической терапии до 10,7 мес.

И. М. Солопаева<sup>1</sup>, В. В. Новиков<sup>2</sup>, Н. М. Иванова<sup>1</sup>,  
Т. В. Аксенова<sup>2</sup>, Е. Н. Филатова<sup>2</sup>

### Влияние хорионического гонадотропина на лимфосаркому Плисса и иммунный ответ крыс-опухоленосителей

<sup>1</sup> Нижегородская государственная медицинская академия

<sup>2</sup> Нижегородский государственный университет

им. Н. И. Лобачевского

**Цель исследования.** Изучение действия хорионического гонадотропина (ХГ) на митотическую активность (МИ) и апоптоз клеток лимфосаркомы Плисса (ЛСП) и на количество CD4<sup>+</sup> мононуклеарных клеток крови у крыс-опухоленосителей.

**Материал и методы.** Опыты поставлены на 80 самцах белых беспородных крыс массой 180–200 г. Опухолевые клетки и ХГ вводили подкожно, забивали крыс через 10 сут после перевивки опухоли, количество митозов подсчитывали в 400 полях зрения, при этом в среднем просматривали 68 клеток в 1 поле зрения. О темпах роста опухоли судили по результатам линейных замеров ее размеров. Апоптоз клеток опухоли и мононуклеарных клеток периферической крови определяли по наличию низкомолекулярной фрагментации ДНК. Относительное содержание CD4<sup>+</sup> мононуклеарных клеток периферической крови оценивали методом непрямой иммуофлюоресценции с помощью моноклональных антител ИКО-101 против CD4-антигена крыс.

**Результаты.** При введении взвеси опухолевых клеток в разных объемах и ХГ в разных дозах обнаружено достоверное снижение МИ клеток ЛСП в 2 раза в сравнении с МИ клеток ЛСП у крыс, не получавших гормон. Через 10 дней после перевивки клеток ЛСП количество CD4<sup>+</sup>-клеток периферической крови крыс-опухоленосителей снижалось в 3,7 раза в сравнении с интактными крысами. Содержание этих клеток у крыс-опухоленосителей, получавших ХГ, к этому сроку оказалось нормальным. Обнаружена способность ХГ индуцировать апоптоз в клетках ЛСП, причем гормон в дозе 75 ЕД оказался более эффективным, чем в дозе 150 ЕД, т. е. влияние ХГ на апоптоз оказалось дозозависимым. При этом ХГ не индуцировал апоптоз мононуклеарных клеток периферической крови крыс.

**Выводы.** Показано, что ХГ, тормозя воспроизводство клеток ЛСП и усиливая гибель этих клеток путем апоптоза, оказывает губительное действие на состояние опухоли, что приводит к торможению ее роста. Большое значение для коррекции онкозависимого иммунодефицита, развивающегося при росте ЛСП, имеет нормализация количества CD4<sup>+</sup>-клеток под влиянием ХГ. Полученные результаты защищены патентами РФ № 2263513 от 10.11.2005 г. и № 2263514 от 10.11.2005 г.

*А. Н. Стуков, В. А. Филлов, Б. А. Ивин, С. А. Коньков*  
**Сравнительное изучение противоопухолевой активности хлонинола и CCNU в эксперименте**  
 ГУ НИИ онкологии им. проф. Н. Н. Петрова, Санкт-Петербург

**Цель исследования.** Провести изучение противоопухолевой активности нового отечественного противоопухолевого препарата из класса алкилнитрозомочевин хлонинола в сравнении с CCNU на модели карциномы Льюис у мышей.

**Материал и методы.** Исследование проводили на 60 мышцах C<sub>57</sub>Bl (по 10 мышей в группе) с перевитой под кожу карциномой Льюис. Хлонинол и CCNU вводили в максимально переносимых дозах (соответственно 20 и 50 мг/кг) внутривентриально однократно через сутки (1-я серия экспериментов) или через 5 сут (2-я серия) после перевивки опухоли. Результаты оценивали по торможению роста опухоли в разные сроки и по площади под кинетической кривой (AUC) роста опухоли.

**Результаты.** При введении хлонинола через сутки после перевивки торможение роста опухоли к 10-му дню после перевивки составило 100 %, к 14-му дню — 96 % и к 18-му дню — 92 %; при введении CCNU — соответственно 94, 52 и 18 %. AUC роста опухоли оказалась равной в контроле в среднем 7558±656, при лечении хлонинолом — 350±312, при лечении CCNU — 3988±532, или в процентах к контролю соответственно 100, 5 и 50 % (разница между группой «хлонинол» и группой «CCNU» статистически достоверна;  $p < 0,001$ ). При введении хлонинола через 5 сут после перевивки торможение роста опухоли составило к 10-му дню — 92 %, к 14-му дню — 91 % и к 18-му дню — 92 %; при введении CCNU — соответственно 44, 35 и 44 %. AUC роста опухоли оказалась равной в контроле в среднем 8658±492, при лечении хлонинолом — 726±456, при лечении CCNU — 5092±448, или в процентах к контролю соответственно 100, 8 и 60 % (разница между группой «хлонинол» и группой «CCNU» статистически достоверна;  $p < 0,001$ ).

**Выводы.** На модели карциномы Льюис у мышей установлено, что противоопухолевый препарат из класса алкилнитрозомочевин хлонинол обладает выраженным и устойчивым противоопухолевым эффектом, значительно превосходящим противоопухолевую активность широко применяемого в клинике препарата CCNU.

*Л. В. Татьянаенко, Н. П. Коновалова, Г. Н. Богданов, О. В. Доброхотова, Б. С. Федоров*

**Ингибирование активного транспорта ионов кальция металлокомплексами Pt (IV) и Pd (II). Корреляция этого процесса с антиметастатическим действием препаратов**

*Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка*

**Введение.** Известно, что патогенез метастазирования включает в себя ряд последовательных процессов, в т. ч. образование тромбов с последующей адгезией метастазирующих клеток к эндотелию капилляров. Это послужило основанием для проведения исследования влияния металлокомплексов Pt (IV) и Pd (II) пиридинкарбоновых кислот на степень активного транспорта ионов Ca<sup>2+</sup> в везикулы саркоплазматического ретикула (СР), приводящие к изменению нормального соотношения вне- и внутриклеточного содержания ионов Ca<sup>2+</sup>, и сопоставления этих данных со степенью ингибирования метастатического процесса.

**Материал и методы.** Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-зависимую АТФазу СР выделяли из белых мышц задних конечностей кролика методом дифференциального центрифугирования. Гидролитическую активность фермента рассчитывали из tg угла наклона кинетической кривой гидролиза АТФ. О скорости изменения концентрации Ca<sup>2+</sup> судили по времени их полного поглощения везикулами СР.

**Результаты.** Показано, что ряд новых соединений металлокомплексов Pt (IV) и Pd (II) на основе пиридинкарбоновых кислот преимущественно ингибирует активный транспорт ионов Ca<sup>2+</sup> по сравнению с гидролизом АТФ мембраносвязанной Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТФазой СР. При этом наблюдается разобщение гидролиза АТФ и активного транспорта ионов Ca<sup>2+</sup> в присутствии вышеуказанных соединений. Изменяющееся при этом соотношение вне- и внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> вызывает нарушение адгезии тромбоцитов, их связи с метастазирующими клетками опухоли. Анализ связи степени антиметастатической активности и степени разобщения транспорта Ca<sup>2+</sup> указывает на прямую корреляцию этих эффектов.

**Выводы.** Полученные нами данные показывают, что одним из возможных механизмов торможения роста экспериментальных метастазов меланомы В16 исследованными металлокомплексами является ингибирование активного транспорта ионов Ca<sup>2+</sup> через биологические мембраны. Индекс ингибирования метастазов меланомы В16 составляет от 50 до 90 %.

*И. И. Файнгольд<sup>1</sup>, Н. П. Коновалова<sup>1</sup>, Р. А. Котельникова<sup>1</sup>, Г. Н. Богданов<sup>1</sup>, Е. С. Фрог<sup>1</sup>, Д. В. Мищенко<sup>1</sup>, В. С. Романова<sup>2</sup>*  
**Фуллерилнитраты как адьюванты цитостатической химиотерапии**

<sup>1</sup> *Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка*

<sup>2</sup> *Институт элементоорганических соединений*

*им. А. Н. Несмеянова РАН, Москва*

**Введение.** Фуллерилнитраты (ФН) образуют особую группу новых производных фуллера C<sub>60</sub>, особенностью которых является их способность выступать в качестве доноров монооксида азота. В экспериментальной онкологии для доноров NO установлена триада противоопухолевых свойств: подавление метастазирования, торможение развития резистентности к цитостатикам и адьювантное действие при комбинации с цитостатиками.

**Цель исследования.** Проанализировать способность ФН донорить монооксид азота и изучить их противоопухолевую активность.

**Материал и методы.** В качестве исследуемых соединений в работе использовались впервые синтезированные фуллерилнитраты: фуллерилмоноснитрат (ФМН) и фуллерилдинитрат (ФДН). Объект исследования — лейкомия P388 у мышей линии BDF<sub>1</sub>.

При комбинированной химиотерапии препараты вводили внутривентриально: циклофосфан (ЦФ) в дозе 0,1×10<sup>-3</sup> моль/кг на 1-е и 6-е сутки, ФМН и ФДН ежедневно в течение 6 дней в дозе 0,5×10<sup>-3</sup> и 0,48×10<sup>-3</sup> моль/кг соответственно. Критериями эффективности служили увеличение продолжительности жизни, а также количество выживших животных.

**Результаты.** При изучении механизма биотрансформации ФН установлено, что ФН ингибируют каталитическую активность цитохром-с-оксидазы в митохондриях клеток головного мозга крыс вследствие генерации монооксида азота, который связывается с гемом активного центра фермента.

Комбинированной терапией (ФДН+ЦФ) достигается почти двукратное увеличение продолжительности жизни животных по сравнению с терапией одним ЦФ (количество выживших животных при этом составило 15 %). При использовании комбинации (ФМН+ЦФ) увеличение продолжительности жизни составило 265 % при выживании 60 % животных.

**Выводы.** Полученные данные свидетельствуют о высокой активности фуллерилнитратов, усиливающих терапевтический эффект циклофосфана.

*Б. С. Федоров, М. А. Фадеев, И. В. Высторон,  
Н. П. Коновалова, Т. А. Сашенкова*

### Метаболически активные доноры NO в качестве антиметастатических и адьювантных средств в цитостатической терапии опухолей

*Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка*

В продолжение работ по изучению влияния природы группировок, способных генерировать монооксид азота в условиях биотрансформации, на антиметастатическую и противоопухолевую активность препаратов из группы метаболически активных соединений нами осуществлен синтез ряда оксиамидов. В него, в частности, вошли замещенные амиды на основе янтарной кислоты. Методом ЭПР *in vitro* показано, что эти соединения способны генерировать в условиях биотрансформации NO. В то же время обнаружено, что они обладают высокой растворимостью в физиологических средах и антиметастатическим действием. Они способны в комбинированной цитостатической терапии усиливать терапевтический эффект известных цитостатиков (циклофосфана и цисплатина).

Использование нами N-(2-нитроксипропил)изоникотинамида в сочетании с минимальными дозами цисплатина позволяет полностью ингибировать процесс метастазирования при экспериментальной меланоме B16. Полного ингибирования процесса метастазирования при экспериментальной меланоме B16 удается достичь и в случае использования нескольких оксиамидов (производных янтарной кислоты) в качестве хемосенсибилизаторов при цитостатической терапии в присутствии циклофосфана. Кроме того, несколько оксиамидов (замещенных дикарбоновых кислот) при цитостатической комбинированной химиотерапии опухолей проявляют высокий терапевтический эффект при лейкозах (100%-е выживание животных при лейкемии P388). Причем и оксиамид дикарбоновой кислоты, и цитостатик используется в очень низких дозах.

Особый интерес представляет группа циклических производных оксиамидов — продуктов конденсации оксиамидов с кетонами. Так, (DL) 1-гидрокси-3,7,7,9,9-пентаметил-1,4,8-триазаспиро[4.5]декан-2-он (нетоксичный в дозе 1000 мг/кг) самостоятельно ингибирует процесс метастазирования при экспериментальной меланоме B16 на 87 % (для сравнения ИИМ цисплатина в сравнимых условиях составляет 92 %).

Таким образом, применение производных оксиамидов карбоновых кислот индивидуально или в качестве добавок к известным цитостатикам позволяет без потери лечебного эффекта резко снизить терапевтические дозы вводимых препаратов.

*А. Е. Щекотихин<sup>1</sup>, А. А. Штиль<sup>2</sup>, В. Н. Буянов<sup>3</sup>,  
М. Н. Преображенская<sup>1</sup>*

### Цитотоксичность новых нафтоиндольных аналогов триптофана и триптамина для опухолевых клеток с лекарственной устойчивостью

<sup>1</sup> ГУ НИИНА им Г. Ф. Гаузе, Москва

<sup>2</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>3</sup> РХТУ им. Д. И. Менделеева, Москва

**Введение.** Ранее нами было показано, что производные 4,11-дигидроксиафто[2,3-]индол-5,10-диона вызывают гибель опухолевых клеток с множественной лекарственной устойчивостью. С другой стороны, спектр биологической активности производных триптофана и триптамина широк. Поэтому синтез аналогов триптофана и триптамина в ряду 4,11-дигидроксиафто[2,3-]индол-5,10-диона перспективен для поиска новых важных соединений.

**Цель исследования.** Разработка методов синтеза аналогов триптофана и триптамина в ряду 4,11-дигидроксиафто[2,3-]индол-

5,10-диона и изучение их антипролиферативной активности на культивируемых линиях клеток человека с экспрессией Р-гликопротеина (Pgp) или нефункционирующим p53 — важнейшими детерминантами лекарственной устойчивости.

**Результаты.** Для получения нафтоиндольных аналогов триптофана и триптамина нами адаптированы их традиционные методы синтеза на основе грамина с учетом лабильности нафтоиндольного хромофора к реакциям восстановления и гидролиза. Изучение антипролиферативной активности новых соединений показало, что нафтоиндольный аналог триптофана нетоксичен в концентрациях < 50 мМЕ, тогда как его этиловый эфир вызывает гибель клеток карциномы кишечника НСТ-116, хотя и в более высоких концентрациях, чем адриамицин (IC<sub>50</sub> = 15,0 и 1,6 мМЕ соответственно). Среди аналогов триптамина 3-(2-аминоэтил)-4,11-дигидроксиафто[2,3-]индол-5,10-дион (1) важен для преодоления лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Так, для клеток лейкоза K562 и Pgp-положительной сублинии K562i/S9 индекс резистентности для триптамина 1 ниже, чем для адриамицина (0,6 и 14,3 соответственно). Кроме того, соединение 1 одинаково токсично для клеток рака толстой кишки НСТ116 (p53<sup>+/+</sup>) и ее варианта с инактивной p53, причем активност в отношении клеток НСТ116p53KO (p53<sup>-/-</sup>) выше, чем для адриамицина (IC<sub>50</sub> = 1,2 и 4,4 мМЕ соответственно). Аналог α-метилтриптамина (3-(2-аминопропил-1)-4,11-дигидроксиафто[2,3-]индол-5,10-дион) в 3–4 раза менее активен.

**Выводы.** Новый аналог триптамина в ряду 4,11-дигидроксиафто[2,3-]индол-5,10-диона вызывает гибель опухолевых клеток с различными механизмами устойчивости к противоопухолевым препаратам.

*Н. К. Юркинович<sup>1</sup>, С. А. Беляев<sup>1</sup>, Н. В. Голуб<sup>1</sup>,  
Т. Л. Юркинович<sup>1</sup>, Ф. Н. Капуцкиш<sup>1</sup>, Д. П. Веевник<sup>2</sup>*

### Получение полимерной формы темозоломида на основе высокозамещенного фосфата декстрана

<sup>1</sup> НИИ физико-химических проблем Белгосуниверситета, Минск

<sup>2</sup> ЛПУ 9-я клиническая больница, Минск

**Введение.** Одним из перспективных методов повышения эффективности лекарственных веществ (ЛВ) является получение их полимерных форм с использованием полимеров-носителей. Полимерные формы лекарственных веществ позволяют уменьшить токсичность ЛВ, пролонгировать их действие, обеспечить целенаправленный транспорт ЛВ к пораженному участку.

Определенный интерес вызывает использование в качестве полимеров-носителей модифицированных полисахаридов благодаря удачному сочетанию их физико-химических (наличие ионогенных групп, высокая степень набухания) и медико-биологических свойств (биосовместимость, нетоксичность, способность рассасываться в тканях организма без воспалительной реакции, относительная устойчивость в биологических средах). Одним из наиболее перспективных полисахаридов является высокозамещенный фосфат декстрана (ВЗФД), представляющий собой ограниченно набухающий гель.

**Цель исследования.** Изучение закономерностей фосфорилирования декстрана в системе H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/CCl<sub>4</sub>, получение фосфата декстрана с высокой степенью замещения и создание на его основе полимерной формы темозоломида (temodal, Schering-Plough).

**Результаты.** Установлена зависимость накопления фосфорнокислых групп от соотношения компонентов реакционной смеси и температуры, а также от времени проведения реакции. Изучено влияние количества фосфорнокислых групп ВЗФД на степени набухания.

Токсиколого-гигиенические исследования показали, что ВЗФД не обладает раздражающими и сенсибилизирующими свойствами, генотоксичностью, мутагенной и потенциальной канцерогенной активностью в отношении тестерных штаммов *Salmonella typhimurium* TA-100 (степень мутагенности 0 баллов).

Для создания полимерной формы темозоломида ЛВ вводили в рассчитанный объем геля фосфата декстрана, доводили pH до значения 7,2–7,4 и лиофильно сушили.

**Выводы.** Проведенные медико-биологические испытания показали, что полимерная форма темозоломида на основе ВЗФД хорошо себя зарекомендовала в локальной химиотерапии, используемой на этапе оперативного лечения, и способствует удлинению безрецидивного периода у больных с наиболее злокачественными формами опухолей головного мозга.

# ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ

А. З. Альяшиев

## Спонтанная флюоресценция в гастроинтестинальных стромальных опухолях прямой кишки

ГОУВПО Мордовский государственный университет имени

Н. П. Огарева, Саранск

**Введение.** Гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСТ) — это саркомы мягких тканей, возникающие из мезенхимальной ткани ЖКТ. ГИСТ — редкие опухоли, составляющие менее 0,1–3 % всех злокачественных новообразований ЖКТ (10–20 случаев на 1 млн населения). Поверхность опухоли изъязвлена, на разрезе выявляются поля некроза и кровоизлияний.

**Цель исследования.** Изучить диагностическую селективность накопления эндогенных флюорохромов (ЭФ) в опухоли, очаге воспаления и внешне неизмененных тканях прямой кишки *in vivo* (эндоскопически) и *ex vivo* (лазерно-спектроскопическим экспресс-методом удаленного макропрепарата).

**Материал и методы.** Использован клинический диагностический комплекс для флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии рака ДТК-3М (ЦЕНИ ИОФ им. А. М. Прохорова РАН, Москва). Аутофлюоресценция (АФ) биотканей связана с молекулами дыхательной цепи окислительного фосфорилирования, флавинами, эндогенными порфиринами, ароматическими аминокислотами (тирозин, триптофан, фенилаланин), экстрацеллюлярными эластином и коллагеном. Реальные спектральные характеристики обусловлены и АФ депозитов перекисного окисления липидов, продуктов некроза, количества кровеносных сосудов, гемоглобина и пигмента.

**Результаты.** АФ изучили у 2 больных с неэпителиальными опухолями прямой кишки (лейомиосаркома и злокачественная неходжкинская лимфома): в одном случае *ex vivo*, а в другом — *in vivo*. Контроль: 7 пациентов без патологии в прямой кишке, 1 — с воспалительными заболеваниями и 9 — с колоректальным раком. АФ здоровой слизистой оболочки прямой кишки составила  $6,33 \pm 0,606$  отн. ед.; коэффициент диагностической контрастности (КДК) (к слизистой оболочке нижней губы) — 0,71, при язвенном ректите — 5,081 и 0,77, при ворсинчатой аденоме — 4,89 и 0,63, при раке — 15,9 и 0,76 соответственно.

**Выводы.** 1. Диагностическая ценность эндоскопической лазерно-индуцированной АФ (ЭЛИАФ) при раке прямой кишки мала ввиду низкой концентрации ЭФ в опухолевой ткани (прежде всего, протопорфирина IX и его дериватов). 2. Неэпителиальные опухоли прямой кишки склонны к повышенной АФ в красной области спектра: спектральные кривые имеют характерную форму и пик при  $\lambda=684$  нм, интенсивность АФ —  $31,765 \pm 5,944$  отн. ед., КДК —  $5,6 \pm 0,729$  ( $p < 0,001$ ). 3. ЭЛИАФ-диагностика ГИСТ требует дальнейшего изучения.

Е. Г. Вакуловская, В. В. Кузнецов, А. Н. Грицай

## Флюоресцентная диагностика у больных раком шейки и раком тела матки с фотосенсибилизатором аласенс

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

**Цель исследования.** Разработать методы флюоресцентной диагностики (ФД) у больных раком шейки и раком тела матки с использованием отечественного фотосенсибилизатора аласенс (ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Москва), оценить эффективность ФД в этих группах больных.

**Материал и методы.** Во время 2-й фазы клинических испытаний выполнялось открытое проспективное исследование ФД с препаратом аласенс (АС) у 28 больных раком шейки матки  $T_{1a-b}N_0-xM_0$  (РШМ) и 12 больных раком тела матки  $T_1N_0M_0$  (РТМ). В исследование были включены большие-добровольцы — женщины в возрасте от 32 до 68 лет, средний возраст которых составил в группе больных РШМ  $41,3 \pm 8,7$  лет, у больных РТМ —  $54,9 \pm 7,5$  лет. У пациенток с РШМ при морфологическом исследовании был выявлен плоскоклеточный рак (в 2 случаях низкодифференцированный), у больных РТМ — различные виды аденокарциномы. 5 больным РШМ проведена ранее лучевая терапия (СОД 30 Гр), 8 больным РТМ — раз-

дельное диагностическое выскабливание полости матки (не менее, чем за 4 нед. до проведения ФД). Для выполнения ФД использовался отечественный фотосенсибилизатор АС (5-аминолевулиновая кислота, предшественник эндогенного фотоактивного протопорфирина IX). АС в однократной дозе 20 или 30 мг/кг массы тела больной, растворенный в 100–200 мл негазированной питьевой воды, принимался внутрь за 4 ч до проведения ФД. Пациентки после введения препарата ограничивали пребывание на прямом солнечном свете на 24 ч. ФД проводилась до введения АС через 4 и 24 ч после приема внутрь раствора АС. В качестве источника излучения, возбуждающего флюоресценцию протопорфирина 9 в тканях, использовалась флюоресцентно-спектроскопическая установка ЛЭСА-01 (ЗАО «Биоспек», Москва) для регистрации спектров интенсивности флюоресценции и определения флюоресцентной контрастности на границе «опухоль-норма» — He-Ne-лазер (633 нм).

**Результаты.** При назначении внутрь раствора препарата АС не было отмечено фототоксических реакций кожи лица и открытых участков тела при соблюдении больными ограниченного светового режима в течение первых 24 ч после введения АС, а также других проявлений общих местных и токсических реакций. Динамическое наблюдение за показателями крови и мочи показало отсутствие гемато-, нефро- и гепатотоксичности препарата АС и ФД с его использованием. При ФД у всех больных РШМ и РТМ наблюдалась флюоресценция клинически определяемых очагов со смещением пика флюоресценции протопорфирина IX в более длинноволновую часть спектра. При спектрометрии кожи лица и рук, слизистой оболочки нижней губы пациенток через 4 ч после приема препарата отмечалось достоверное увеличение интенсивности флюоресценции по сравнению с исходным фоновым, фототоксичность была кратковременной и сохранялась не более 24 ч. Флюоресцентная контрастность на границе «опухоль-норма» варьировала от 2,1:1 до 4,1:1 у различных пациенток. У больных РШМ отмечалась в большинстве случаев неомогенность зоны флюоресценции с различиями между минимальным и максимальным флюоресцентным контрастом 22–34 %. У 64,3 % больных РШМ и 66,7 % РТМ определяемые при ФД границы зоны флюоресценции совпадали с определяемыми клинически границами опухоли, а у 35,7 и 33,3 % — превышали клинические определяемые границы опухоли на 0,3–0,8 см. Не отмечено различий в интенсивности флюоресценции и флюоресцентном контрасте у больных при приеме АС в дозе 20 и 30 мг/кг массы тела. У 1 больной выявлена дополнительная зона флюоресценции, при морфологическом исследовании биоптата обнаружена высокодифференцированная аденокарцинома.

**Выводы.** Таким образом, нами разработаны методы ФД у больных РШМ и РТМ с использованием препарата АС; отмечена высокая чувствительность и специфичность ФД и возможность определять границы опухолевого роста. Проведение ФД не сопровождалось побочными эффектами, кроме кратковременной световой токсичности.

С. Ю. Васильченко<sup>1</sup>, А. И. Волкова<sup>1</sup>, С. Б. Коровин<sup>1</sup>,

В. Б. Лоценков<sup>1</sup>, М. Л. Синяева<sup>2</sup>, Ад. А. Мамедов<sup>2</sup>,

Е. А. Лукьянец<sup>3</sup>, С. Г. Кузьмин<sup>4</sup>

## Исследование флюоресцентных свойств наночастиц фталоцианина алюминия в микроповреждениях эмали зубов

<sup>1</sup> ЦЕНИ ИОФ РАН, Москва

<sup>2</sup> Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова

<sup>3</sup> ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Москва

<sup>4</sup> ГУП МНКЦ «Интермедбиофизхим», Москва

Диагностика микроповреждений эмали имеет большое значение в стоматологии для предупреждения развития кариеса. Микроповреждения эмали связаны с локальным дефицитом кальция в эмали и характеризуются изменением состава, формы, размеров и взаимной ориентации кристаллов гидроксиапатита, являющихся основными структурными единицами эмали. Недостатком методов, используемых в современной клинической стоматологии для диагностики раннего кариеса и повреждений эмали зуба (визуальный

осмотр полости рта, зондирование, витальное окрашивание эмали специальными красителями и др.), является то, что они не предназначены для диагностики микроповреждений эмали и способны выявить лишь повреждения достаточно больших размеров или кариес в стадии «белого пятна».

Целью исследования являлось изучение возможности применения флюоресцентной диагностики микроповреждений эмали зубов с использованием наночастиц неводорастворимого фталоцианина алюминия, полученных из исходного крупнодисперсного препарата путем ультразвуковой диспергации. Для апробации метода использовались зубы различной групповой принадлежности, удаленные по клиническим показаниям. Измерение флюоресценции проводилось с помощью волоконно-оптического спектрометра LESA-01-BIOSPEC (ЗАО «Биоспек», Россия), возбуждение флюоресценции осуществлялось He-Ne-лазером (длина волны 632,8 нм). Также проведено исследование динамики интенсивности флюоресценции наночастиц фталоцианина алюминия в микроповреждениях эмали. Обнаружен эффект «разгорания» флюоресценции фталоцианина алюминия в зонах микроповреждения эмали зуба.

*В. Н. Волгин, Т. В. Соколова, И. А. Ламоткин, М. В. Садовская*  
**Применение фотодитазина при фотодинамической терапии заболеваний различной этиологии**

*Главный военный клинический госпиталь имени  
акад. Н. Н. Бурденко, Москва*

**Введение.** В последнее время все больше расширяется спектр применения фотодинамической терапии (ФДТ) при различных заболеваниях.

**Цель исследования.** Разработка оптимальных режимов ФДТ с фотосенсибилизатором фотодитазином при различной патологии кожи и слизистых.

**Материал и методы.** В Главном военном клиническом госпитале имени Н. Н. Бурденко лечение методом ФДТ проведено 57 больным. Спектр заболевания и средний возраст больных приведены в табл. 1.

**Таблица 1.** Возрастной состав пролеченного контингента методом ФДТ

Заболевание	Количество больных		Средний возраст
	абс.	%	
Базальноклеточный рак кожи	43	75,7	71,2
Плоскоклеточный рак кожи	1	1,7	76,0
Метатипический рак кожи	1	1,7	52,0
Кератома	9	15,8	61,3
Лейкоплакия	2	3,4	61,0
Эрозия шейки матки	1	1,7	28,0
Всего...	57	100	68,3

Преобладали больные базальноклеточным раком кожи (БКРК) — 75,4 %. Средний возраст всей группы составил 70 лет. Всем больным проведено лечение методом ФДТ. Использовали лазерную установку «АТКУС» (Россия). Выходная мощность лазера 0,1–2,0 Вт. Во время лечения плотность мощности излучения была от 0,1 до 0,8 Вт/см<sup>2</sup>. Количество вводимого фотосенсибилизатора рассчитывалось на 1 кг массы тела больного — 0,6–0,8 мг/кг. Длительность облучения зависела от размера опухоли и составляла от 30 с до 10 мин. В случае возникновения локальной болезненности делали перерыв в течение нескольких минут, т. е. облучение проводили фракционно. Для облучения опухолей использовали световод с микролинзой на конце.

Сеансы ФДТ, а также динамическое наблюдение за больными и их перевязки в большинстве случаев проводили амбулаторно. Количество визитов больного к врачу, начиная с первичного осмотра и до результатов оценки эффективности выбранного метода терапии (спустя 2 мес.), составляло в среднем 7 раз.

У 57 больных было 80 очагов.

**Результаты.** Оценка эффективности ФДТ проводилась по следующим критериям: полная регрессия (ПР) опухоли — отсутствие визуальных и пальпаторных признаков опухолевого роста; частичная регрессия (ЧР) — уменьшение размеров опухоли не менее чем на 50 %; без эффекта (БЭ) — уменьшение размера опухоли менее чем на 50 %. При этом следует учитывать, что ЧР оценивается как положительный терапевтический эффект. В соответствии с общепринятой установкой в онкологии оценка непосредственных результатов ФДТ производилась через 2 мес. Этот срок в большинстве случаев был достаточным для регрессии опухолей и эпителизации дефектов кожи.

Результаты лечения отражены в табл. 2.

**Таблица 2.** Эффективность ФДТ БКРК

Заболевание	Количество больных	Результаты ФДТ			
		ПР		ЧР	
		абс.	%	абс.	%
Базальноклеточный рак кожи	43	39	90,7	4	9,3
Плоскоклеточный рак кожи	1	1	—	—	—
Метатипический рак кожи	1	1	—	—	—
Кератома	9	9	—	—	—
Лейкоплакия	2	2	—	—	—
Эрозия шейки матки	1	1	—	—	—
Всего...	57	53	91,2	4	8,8

Из данных табл. 2 видно, что полная регрессия очагов поражения наступила у 53 (91,2 %) больных, частичная — у 4 (8,8 %). Оба результата принято оценивать как положительный терапевтический эффект. 4 рецидива было только у больных БКРК. В 4 случаях с ЧР проведен повторный курс ФДТ, после чего в процессе наблюдения отмечена полная регрессия опухолей. При диспансерном наблюдении 53 больных в сроки от 2 до 6 мес. рецидивов заболевания не наблюдалось.

При лечении использовали различные дозы световой энергии — от 150 до 500 Дж/см<sup>2</sup>. При поверхностных опухолях доза составляла 150–250 Дж/см<sup>2</sup>, при солидных образованиях — 250–300 Дж/см<sup>2</sup>, а при язвенных, экзофитных формах БКРК и опухолях с глубоким инфильтративным ростом — 300–500 Дж/см<sup>2</sup>.

**Выводы.** Проведенный анализ позволяет сделать вывод, что ФДТ можно использовать при заболеваниях различной этиологии с высоким терапевтическим эффектом.

*Н. Ф. Гамалея, И. А. Лисняк, В. В. Куценко, О. Б. Горбеев*  
**Влияние ФДТ с применением в качестве фотосенсибилизатора 5-аминолевулиновой кислоты на ангиогенез и метастазирование карциномы Льюиса**

*Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, Киев*

**Цель исследования.** Изучение влияния фотодинамической терапии (ФДТ) на опухолевый ангиогенез и метастазирование у мышей с карциномой Льюиса.

**Материал и методы.** Экспериментальной моделью опухолевого роста и метастазирования служила мышьяная карцинома легких Льюиса. Для ФДТ использовали фотосенсибилизатор II поколения — 5-аминолевулиновую кислоту (5-АЛК), синтезированную в Институте органической химии НАН Украины, лазерное излучение с длиной волны 633 нм и плотностью мощности 150 мВт/см<sup>2</sup> при экспозиции 20 мин.

Противоопухолевую активность ФДТ определяли по торможению роста первичных опухолей и степени метастатического поражения легких. Содержание фактора роста эндотелиальных клеток (VEGF) в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом.

**Результаты.** Анализ полученных данных показал выраженное торможение под влиянием АЛК-ФДТ роста первичных опухолей,



достигавшее 93 %. Одновременно отмечено значительное угнетение метастатического процесса: количество животных без метастазов в группе, подвергнутой ФДТ, было в 5 раза большим по сравнению с животными контрольной группы, где лечения не проводилось. У тех животных, у которых метастазы все же выявлялись, наблюдалось уменьшение их количества и размеров. Параллельно с торможением роста первичной опухоли и угнетением метастатического процесса отмечались значительное снижение содержания в сыворотке крови медиатора ангиогенеза — VEGF и угнетение процесса васкуляризации в легочных метастазах, относительную интенсивность которого определяли по соотношению количества метастазов, находившихся в аваскулярной и васкулярной фазах развития. У животных, которые были подвергнуты АЛК-ФДТ, среднее количество метастазов в васкулярной фазе развития было в 10 раз ниже контрольных значений.

**Выводы.** ФДТ с применением в качестве фотосенсибилизатора 5-АЛК вызывает значительное угнетение роста первичной опухоли и развития процессов метастазирования с одновременным снижением концентрации VEGF в крови и торможением васкуляризации легочных метастазов. Полученные результаты указывают на наличие васкулярно-направленного компонента в противоопухолевом эффекте ФДТ с использованием 5-АЛК.

*Л. Г. Гатинская, Н. А. Дмитричева, Е. В. Игнатьева,  
Б. С. Кикоть, И. В. Ярцева*

#### **Изучение растворимости тиосенса**

*ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*

**Введение.** Тиосенс — тетра-3-фенилтиофталоцианин алюминия гидроксида — новый инфракрасный фотосенсибилизатор, синтезированный в ФГУП ГНЦ «НИОПИК», проходит доклиническое исследование с целью передачи на клинические испытания для ФДТ злокачественных опухолей.

**Цель исследования.** Изучение растворимости тиосенса в различных растворителях, необходимое при стандартизации субстанции препарата и выборе оптимальной лекарственной формы.

**Материал и методы.** Работа выполнена на образцах тиосенса, синтезированных в ФГУП ГНЦ «НИОПИК». Использовались органические растворители марки «ХЧ», хроматографические пластинки Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merk, Германия). Система растворителей хлороформ-метанол-аммиак (87:12:1) подобрана экспериментально. Электронные спектры поглощения снимали на регистрирующем спектрофотометре НТАСНИ-U-3210 (Япония).

**Результаты.** Образцы всех серий нерастворимы в воде и 0,1 М кислоте хлористоводородной (растворитель над исследуемым веществом не окрашивается). При обработке всех образцов в органических растворителях основная часть вещества растворяется при добавлении небольших количеств растворителя с образованием интенсивно окрашенных растворов. Не растворившееся сразу вещество остается в виде небольшого количества расплывающихся темных точек (хлороформ, диметилсульфоксид, диметилформамид) или в виде мелкодисперсного осадка (спирт этиловый, эфир диэтиловый). Для растворения этой части вещества требуется добавление дополнительных количеств растворителя, очень значительных в случае спирта этилового и эфира диэтилового. Дисперсный осадок, очень плохо растворяющийся в спирте, отделяли, растворяли в хлороформе и хроматографировали в тонком слое на одной пластине с пробами спиртового раствора вещества и вещества, растворенного непосредственно в хлороформе. Хроматограммы всех проб идентичны. Электронные спектры поглощения хлороформных растворов тиосенса и его фракций (растворимой и нерастворимой в спирте этиловом) также идентичны.

**Выводы.** Особенности растворимости тиосенса предположительно связаны с существованием различных кристаллических форм вещества. Это затрудняет определение категории растворимости в терминах ГФ XI (вып. 1, с. 175). Условно тиосенс можно отнести к категории малорастворимых веществ в хлороформе, диметилсульфоксиде и диметилформамиде и практически нерастворимых в спирте этиловом и эфире диэтиловом.

*Работа поддержана Правительством Москвы. Авторы благодарят Г. Н. Ворожцова, Е. А. Лукьянца и В. М. Деркачеву за сотрудничество и предоставленные для исследования образцы тиосенса.*

*М. Л. Гельфонд, А. И. Арсеньев, А. С. Барчук*

#### **ФДТ с фотодитазином в паллиативном лечении злокачественных новообразований**

*НИИ онкологии им. проф. Н. Н. Петрова, Санкт-Петербург*

**Введение.** В НИИ онкологии им. проф. Н. Н. Петрова закончены клинические испытания нового отечественного фотосенсибилизатора фотодитазин при фотодинамической терапии злокачественных новообразований.

**Цель исследования.** Клинические испытания фотодитазина при ФДТ рака бронха и базальноклеточного рака кожи.

**Материал и методы.** Сеансы ФДТ проведены 36 больным трахеобронхиальным раком, 3 пациентам с рецидивом рака щитовидной железы с вращением в трахею. Общее число сеансов составило 59. В клинические испытания включено также 115 больных с морфологически верифицированным базальноклеточным раком кожи. Из них у 92 имелась первичная, не леченная ранее опухоль кожи, а в 23 случаях — рецидив после ранее проводившейся в другом лечебном учреждении лазерной коагуляции.

**Результаты.** В ходе клинических испытаний предложен новый алгоритм комбинированной паллиативной терапии при распространенном раке легкого, включающий аргоноплазменную реканализацию просвета органа и, при необходимости, стентирование, ФДТ с последующей брахи- и дистанционной лучевой терапией. ФДТ рака бронха с помощью препарата фотодитазин позволила получить у 74 % больных полный и частичный регресс опухоли, причем в 57 % случаев регресс расценен как полный. Этот результат представляется достаточно успешным, если учесть, что все пациенты имели местнораспространенный рак бронха. У всех 115 больных отмечен полный и длительный регресс опухоли. При клинических испытаниях эффективности фотодитазина нами изучены как эффекты прямого фототоксического повреждения опухолевых клеток в культуре, так и воздействие фотохимических реакций на кровь и ее компоненты. Используя триггерные эффекты сенсibilизированной фотомодификации крови, в ряде случаев вполне можно достичь ее цитотоксического воздействия на злокачественную опухоль. По нашим предварительным данным, реализация цитотоксического действия при химиосенсибилизированной фотомодификации крови реализуется за счет перекисей. Это существенно расширяет возможности применения метода ФДТ.

**Выводы.** Фотодитазин является практически идеальным фотосенсибилизатором, т. к. обладает высокой терапевтической активностью и отсутствием побочных эффектов.

*В. А. Евтушенко, М. В. Вусик, Е. А. Чижииков*

#### **Фотодинамическая терапия рецидивных опухолей кожи с фотосенсибилизатором фотодитазин**

*ГУ НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, Томск*

**Введение.** Лечение рецидивов злокачественных опухолей — более сложная задача, чем лечение первичных поражений. У больных раком кожи, пролеченных ранее лучевым методом, развиваются выраженные трофические изменения покровных тканей, после хирургического лечения наблюдается грубая рубцовая деформация.

**Цель исследования.** Оценка эффективности фотосенсибилизатора фотодитазин (ООО «Вета-Гранд», Москва) и импульсного лазера на красителях (Томский государственный университет) у больных рецидивным базальноклеточным раком кожи.

**Материал и методы.** Лечение проведено 14 больным, диагноз рецидива рака кожи был установлен клинически и подтвержден морфологическими данными. Опухоли локализовались в основном на лице и шеи, площадь поражения составляла от 5 до 80 см<sup>2</sup>. У 1 больного гигантская опухоль площадью 400 см<sup>2</sup> располагалась на спине. Фотодитазин вводился за 2 ч до лазерного воздействия внутривенно капельно в дозе 0,7 мг/кг масс тела в 400 мл физиологического раствора. Накопление сенсibilизатора в опухоли определялось непосредственно перед облучением методом флюоресцентной спектроскопии на установке «Спектр-кластер» (Москва). Применяемая нами лазерная установка на красителях дает возможность плавной перестройки в области красного спектра излучения в широком диапазоне, что позволяет использовать его при работе с различными фотосенсибилизаторами.

**Результаты.** В настоящем исследовании применялось излучение с длиной волны 662 нм, плотность мощности лазерного излучения

составила 400 мВт/см<sup>2</sup>, плотность энергии лазерного излучения — 300–600 Дж/см<sup>2</sup>. Сеансы ФДТ проводились амбулаторно и переносились больными хорошо. Оценены 3-месячные результаты: у 12 больных отмечена полная регрессия опухоли, у 2 пациентов с гигантскими опухолями потребовалось проведение повторных курсов ФДТ.

**Выводы.** ФДТ с фотодитазином может быть успешно применена у больных с рецидивными опухолями кожи. Сенсибилизатор не токсичен, лечение можно проводить амбулаторно.

*В. Н. Капинус, М. А. Каплан*

#### Фотодинамическая терапия с фотосенсибилизатором фотодитазин опухолей кожи лица неудобных локализаций

*ГУ МРНЦ РАМН, Обнинск*

**Введение.** Органосохраняющее лечение опухолей в настоящее время является важной концепцией клинической и экспериментальной онкологии. При использовании традиционных методов лечения опухолей кожи лица высок риск развития анатомо-функциональных нарушений в данной области, поэтому расширение возможностей малоинвазивных методов позволит качественно улучшить результаты лечения и реабилитации больных. В настоящее время благодаря внедрению в клиническую практику фотодинамической терапии (ФДТ) существенно расширился арсенал органосохраняющих методов, т. к. при ФДТ происходит избирательное разрушение опухоли с минимальным повреждением окружающих тканей.

**Материал и методы.** В отделе лазерной и фотодинамической терапии ГУ МРНЦ РАМН была проведена ФДТ с фотосенсибилизатором (ФС) фотодитазин 42 больным, имеющим так называемую неудобную локализацию рака кожи лицевой области (угол глаза, параорбитальная область, крыло носа, носогубные складки, ушная раковина). У всех больных морфологически был верифицирован базальноклеточный рак кожи, а распространенность опухолевого процесса была следующей: T<sub>1</sub> — 13 (31,0 %) больных, T<sub>2</sub> — 26 (61,9 %) и T<sub>3</sub> — 3 (7,1 %). Кроме того, 14 (33,3 %) пациентов получали ранее лечение, и у них наблюдали частичный регресс опухоли или ее рецидив после лучевой терапии, хирургического иссечения, криодеструкции или комплексного лечения.

Всем больным вводился ФС фотодитазин внутривенно капельно после предварительного разведения в физиологическом растворе в дозе 0,6–1,0 мг/кг. Проведение спектрофлуоресцентного анализа через 2 ч после введения ФС позволяло доказать наличие достаточного уровня накопления ФС в опухолевой ткани по отношению к видимо здоровой ткани и визуализировать распространение опухолевого процесса.

В качестве источников лазерного света использовались лазерные аппараты «Аткус-2» и «Ламеда» (662 нм). Облучение опухолей, расположенных параорбитально, проводилось аккуратно с использованием специальных приспособлений для защиты глазного яблока от повреждающего действия лазерного света. К опухолям подводилась световая энергия 100–300 Дж/см<sup>2</sup> в течение 1 сеанса облучения с 1 или нескольких полей.

После ФДТ опухолевых образований параорбитальной области для уменьшения отека и защиты окружающих тканей использовались офтальмологические средства, такие как глазные капли тобродекс, глазной гель солкосерил или актовегин.

**Результаты.** Непосредственные результаты лечения оценивались по критериям ВОЗ: полная регрессия, частичная регрессия, без эффекта.

У 37 (88,1 %) из 42 больных была получена полная регрессия опухолевых очагов, частичная регрессия — у 5 (11,9 %) пациентов, отсутствия эффекта не отмечалось.

При сроке наблюдения от 2 мес. до 4 лет только у 6 (14,3 %) пациентов были диагностированы рецидивы заболевания, по поводу которых были проведены повторные курсы ФДТ с эффектом.

Анализ косметических и органосохраняющих результатов лечения опухолей кожи методом ФДТ с фотодитазин показал, что после проведенного лечения у всех больных сформировались негрубые рубцы, имеющие меньшие размеры, чем первоначальная опухоль, которые практически не деформировали окружающих тканей. Следует особо отметить результаты лечения опухолей параорбитальной области. Так, после фотодинамической терапии с ФС фотодитазин

у всех пациентов не пострадала функция зрения (не изменились цветоощущение и острота зрения), сохранились веки, ресницы, размеры глазной щели и функции этих органов, а сформировавшиеся рубцы являлись еще более нежными, чем на других участках кожи лица. После ФДТ рака кожи носа, ушных раковин в некоторых случаях сохранялась минимальная деформация хрящевых структур.

**Выводы.** ФДТ с ФС фотодитазин является эффективным органосохраняющим методом лечения, который не вызывает функциональных и косметических нарушений. Это позволяет считать ФДТ рациональным методом лечения базальноклеточного рака кожи неудобных локализаций.

*М. А. Каплан, О. А. Скугарева*

#### Интерстициальная фотодинамическая терапия экспериментальной опухоли саркомы М1 с фотосенсибилизатором фотодитазин

*ГУ МРНЦ РАМН, Обнинск*

**Цель исследования.** Разработка методики интерстициальной фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором фотодитазин экспериментальной опухоли саркомы М1.

**Материал и методы.** Работа выполнена на 52 беспородных крысах-самках, которым под кожу в область бедра прививали саркому М1. Животных брали в опыт на 10–14-е сутки после перевивки опухоли. Фотодитазин вводили внутривенно в стандартной дозе 5 мг/кг. Опухоль облучали через 2,5–3 ч после введения ФС с помощью лазерного аппарата «Аткус-2» (мощность 2 Вт, λ 662 нм). Для доставки лазерного излучения к опухоли использовались волоконно-оптические катетеры с гибким цилиндрическим диффузором. Животные были разделены на две группы: в 1-й группе применялась плотность энергии 300 Дж/см<sup>2</sup>, во 2-й группе — 600 Дж/см<sup>2</sup>.

Эффект фотодинамической терапии оценивали на 3, 7, 10, 14 и 21-е сутки после ФДТ по проценту полной регрессии и коэффициенту абсолютного прироста опухоли (К), который рассчитывали по формуле:

$$K = \frac{V_t - V_0}{V_0} \quad V \text{ (см}^3\text{)} = 1/6\pi \cdot d_1 \cdot d_2 \cdot d_3,$$

где  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$  — три взаимно перпендикулярных диаметра опухоли;  $V_0$  — объем опухоли до воздействия;  $V_t$  — объем опухоли на определенный срок наблюдения.

**Результаты.** В группе животных, где плотность энергии составляла 300 Дж/см<sup>2</sup>, коэффициент абсолютного прироста опухоли был значительно ниже и к 21-м суткам составил 4,94, а в контрольной группе — 20,5.

В группе животных с плотностью энергии 600 Дж/см<sup>2</sup> коэффициент абсолютного прироста к 21-м суткам составил 0,45, а в контрольной группе — 69,3. Полная регрессия опухоли наблюдалась в 50 % случаев.

**Выводы.** Полученные результаты позволяют сделать вывод об эффективности интерстициальной ФДТ при лечении злокачественных новообразований, однако требуются дальнейшие исследования для установления оптимальных параметров излучения и дозы фотосенсибилизатора.

*Т. А. Кармакова<sup>1</sup>, Е. В. Филоненко<sup>1</sup>, А. В. Феофанов<sup>2</sup>, В. В. Соколов<sup>1</sup>, Р. И. Якубовская<sup>1</sup>, Е. А. Лукьянец<sup>3</sup>, В. И. Чиссов<sup>1</sup>*

#### Динамика накопления и распределения АЛК-индуцированного протопорфирина IX в ткани базальноклеточного рака

<sup>1</sup> МНИОИ им. П. А. Герцена, Москва

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии РАН, Москва

<sup>3</sup> ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Москва

Распределение и уровень накопления фотосенсибилизатора в ткани-мишени определяют возможности флуоресцентной диагностики опухоли, механизмы фотондуцированного повреждения тканей и эффективность фотодинамического воздействия.

Целью настоящего исследования являлось изучение локализации и кинетики накопления АЛК-индуцированного протопорфирина IX

(РРІХ) в ткани базальноклеточного рака кожи человека (БКР) после применения препарата аласенс.

Методом флюоресцентной микроспектроскопии исследованы криостатные срезы опухолевых тканей 7 пациентов с первично-множественным БКР (I стадия), иссеченные хирургически на разных сроках в течение суток после перорального приема аласенса в виде раствора 20 мг/мл в дозе 30 мг/кг массы тела.

Количественная обработка микроспектральных изображений показала, что при системном применении аласенса АЛК-индуцированный РРІХ детектируется в тканях на протяжении 8 ч после введения препарата и в течение этого периода содержание флюорохрома в тканях опухоли выше, чем в нормальной коже. Высокое содержание РРІХ в опухолевом узле обусловлено его накоплением в опухолевых клетках и в строме, а также в дисплазированном эпидермисе в зоне роста опухоли. Максимум накопления флюорохрома в опухолевых клетках наблюдается через 2 ч после приема аласенса. Содержание РРІХ в строме опухоли в первые 4 ч после введения ниже, чем в опухолевых клетках. В течение 4–6 ч после приема препарата РРІХ выявляется также в стенке кровеносных сосудов кожи.

Таким образом, анализ динамики накопления АЛК-индуцированного РРІХ позволил установить, какие компартменты ткани опухолевого образования являются преимущественным источником специфической флюоресценции в каждый отдельный период времени после приема аласенса. Полученные результаты могут служить дополнительным критерием для оптимизации режимов фотодинамической терапии БКР с препаратом аласенс.

*С. В. Козлов, А. А. Морятов, М. А. Морозова*  
**Оптимизация диагностики и лечения больных со злокачественными новообразованиями пищевода и кардиального отдела желудка**

*Самарский ГМУ, кафедра онкологии  
ГУ Самарский областной онкологический диспансер*

Традиционные методы паллиативной помощи онкологическим больным не удовлетворяют современным требованиям поддержания качества их жизни.

Актуальность исследования обусловлена необходимостью разработки новых малоинвазивных методов помощи больным со злокачественными новообразованиями пищевода и кардиального отдела желудка, осложненными опухолевой стриктурой, с целью улучшения качества их жизни.

Основные задачи исследования — оценить возможность и эффективность применения флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии в исследуемой группе больных, разработать режимы проведения ФДТ, изучить возможность сочетания ФДТ с другими методами лечения.

На кафедре онкологии СамГМУ на базе ГУ СООД метод ФДТ начал применяться с 2003 г. В изучаемую группу включены больные раком пищевода (56) с выраженной дисфагией II–IV степени по Савицкому. Среди них с поражением верхней трети пищевода было 3 больных, средней — 24, нижней — 10, с кардиоэзофагеальным раком — 19; мужчин — 35, женщин — 21. Средний возраст составил 66 лет. Проводилось следующее лечение: хирургическое в радикальном объеме, осложнившееся местным рецидивом, — 5 больных, ПХТ — 5, в т. ч. комплексное лечение — 3, ДГТ — 6, в т. ч. комбинированное — 1, пробные или диагностические операции выполнены 19 пациентам, остальные не получали специального лечения. Гистологически преобладали аденокарцинома (31), плоскоклеточный рак (25), отдаленные метастазы имелись у 24 больных: в печень — 19, канцероматоз брюшной полости — 5.

Для проведения ФД и ФДТ применяли современные отечественные фотосенсибилизаторы фотогем и аласенс; введение системное, в дозировках, рекомендованных МНИОИ им. П. А. Герцена. ФД проводили с помощью установки «Спектр-кластер» с длиной волны возбуждения флюоресценции 510 нм. Для оценки степени и специфичности накопления ФС в ткани опухоли и окружающих тканях ФДТ проводили с лазерным полупроводниковым аппаратом «Кристалл» с длиной волны 630 нм, доставку лазерного излучения осуществляли посредством волоконно-оптического световода с цилиндрическим диффузором-излучателем. Лазером облучали опухолевую поверхность и прилегающие участки с высоким специфичес-

ким накоплением ФС. Дозы лазерного излучения рассчитывались индивидуально по стандартным формулам, предложенным МНИОИ им. П. А. Герцена.

Контроль результата ФДТ проводили эндоскопически с морфологической оценкой и рентгенологически, а при необходимости использовали другие методы исследования (УЗИ, КТ, МРТ). Визуальная реакция опухоли наблюдалась в 100 % случаев в виде отека, инъекции сосудов опухоли, с развитием частичного некроза или полного лизиса опухоли на 20–30-е сутки. Морфологические изменения наблюдались всегда в виде отека, некроза опухоли, воспалительных изменений. Клинический функциональный эффект не всегда соответствовал эндоскопическому осмотру. В 15 (26,7 %) наблюдениях наступило полное разрешение дисфагии, в 32 (57 %) — частичное, у 9 (16 %) больных — без эффекта. Более года наблюдаются 13 больных, среди них стойкая ремиссия с морфологически подтвержденным излечением отмечена в 7 случаях, остальные получают повторные курсы ФДТ. В 11 наблюдениях отмечались осложнения в виде отека и покраснения кожи, связанные с несоблюдением светового режима.

Метод ФДТ можно признать эффективным, позволяющим достичь высокой степени реабилитации у больных со злокачественными новообразованиями полых органов, осложненными феноменом опухолевой стриктуры. Важное преимущество ФДТ — возможность применения у широкой категории больных, в т. ч. и у ослабленных. Изучается возможность применения различных режимов проведения ФДТ, сочетания ее с другими методами противоопухолевого лечения.

*М. А. Кортава<sup>1</sup>, И. Г. Меерович<sup>1</sup>, Г. А. Меерович<sup>2</sup>,  
А. П. Полозкова<sup>1</sup>, И. Ю. Кубасова<sup>1</sup>, Л. М. Борисова<sup>1</sup>,  
М. П. Киселева<sup>1</sup>, Е. В. Игнатъева<sup>1</sup>, О. Л. Орлова<sup>1</sup>,  
З. С. Смирнова<sup>1</sup>, А. Ю. Барышников<sup>1</sup>, Н. А. Оборотова<sup>1</sup>,  
Г. Н. Ворожцов<sup>3</sup>*

**Изучение динамики накопления стерически стабилизированной липосомальной лекарственной формы фотосенса (ССЛЛФФ) в опухолевой и нормальной ткани**

<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>2</sup> ЦЕНИ ИОФ им. А. М. Прохорова РАН, Москва

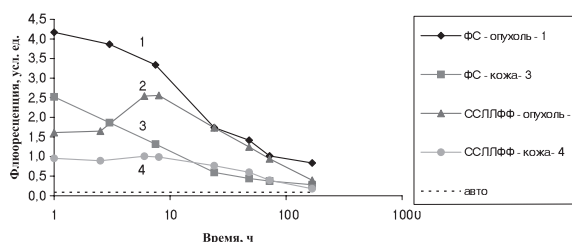
<sup>3</sup> ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Москва

**Введение.** Одной из проблем применения в онкологии фотодинамической терапии с использованием фотосенса является длительная фототоксичность, обусловленная медленным снижением концентрации препарата в коже больного после проведенного лечения.

**Цель исследования.** Изучить динамику накопления ССЛЛФФ в коже и опухоли Эрлиха мышей в сравнении с инъекционной лекарственной формой фотосенса (ФС).

**Материал и методы.** Опухоль Эрлиха перевивали мышам — гибридам F<sub>1</sub> внутримышечно в область бедра асцитной жидкостью по 0,1 мл, содержащей 500 тыс. опухолевых клеток. ССЛЛФФ в терапевтической дозе 1 мг/кг и инъекционную лекарственную форму ФС в терапевтической дозе 4 мг/кг вводили на 5–6-е сут после перевивки, когда размер опухоли составлял в среднем 700 мм<sup>3</sup>. Уровень накопления препаратов в опухоли и коже оценивали спектрально-флюоресцентным методом с использованием спектроанализатора «ЛЭСА-БИОСПЕК» по интенсивности флюоресценции. Возбуждение флюоресценции осуществляли He-Ne лазером с длиной волны 632,8 нм.

**Результаты** (рис. 1).



**Рис. 1.** Динамика интенсивности флюоресценции тканей мышей при введении ФС в разных лекарственных формах (пунктир — уровень автофлюоресценции ткани)

Показано, что через 1 ч после введения ФС интенсивность флюоресценции как в опухоли, так и в коже постепенно снижается. При введении ССЛЛФФ интенсивность флюоресценции в опухолевой ткани нарастает в течение 8 ч, после чего снижается. В коже интенсивность флюоресценции в течение 8 ч не изменяется, после чего снижается до уровня автофлюоресценции. На 7-е сутки после введения ССЛЛФФ уровень интенсивности флюоресценции в коже в 2 раза ниже, чем после введения ФС.

Таким образом, установлено, что выведение ССЛЛФФ из кожи в 2 раза выше, чем ФС, что свидетельствует о возможности снижения кожной фототоксичности фотосенса в новой лекарственной форме.

*Работа выполнена в рамках ФНТП «Разработка и практическое освоение в здравоохранении новых методов и средств профилактики, диагностики и лечения онкологических, инфекционных и других опасных заболеваний».*

*А. А. Красновский*

### **Фосфоресценция синглетного кислорода: есть ли перспективы применения в клинической практике?**

*Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва*

*Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова*

Инфракрасная фосфоресценция кислорода (1270 нм) сопровождается дезактивацию синглетного  $^1\Delta_g$ -состояния молекулярного кислорода, которое, как известно, определяет фотодинамические реакции окисления, лежащие в основе фотодинамической терапии рака и других болезней. Применение этой фосфоресценции в фотохимических и фотобиологических исследованиях стало возможным начиная с 1976 г., когда она была впервые обнаружена автором в аэробных растворах фотосенсибилизаторов [1]. С тех пор ее измерение широко используется в экспериментальной практике, главным образом, для анализа фотохимических моделей фотобиологических и фотомедицинских систем.

Поскольку интенсивность фосфоресценции низка, существенный элемент этих исследований — модернизация экспериментальной техники. Базовыми установками для исследований нашей группы служат приборы на основе охлаждаемых фотоумножителей со спектральной характеристикой С-1 (ФЭУ-83). Нами сконструировано два вида таких приборов. Один использует механические фосфороскопы и пригоден для анализа систем, в которых время жизни синглетного кислорода превышает 1 мс. Эти приборы удобны для тестирования фотосенсибилизирующей активности липофильных красителей и измерения констант скоростей тушения синглетного кислорода липофильными соединениями. Приборы 2-го типа используют импульсное лазерное возбуждение, разрешенный во времени счет фотонов и накопление сигнала от большого числа лазерных импульсов. С помощью таких приборов удается надежно регистрировать кинетические параметры фосфоресценции кислорода в водных системах, в которых квантовый выход фосфоресценции менее 10<sup>-7</sup> [2].

В последние годы этот тип приборов получил широкое распространение благодаря созданию фирмой «Хамаматсу» фотоумножителей нового поколения с полупроводниковым фотокатодом (InGaAs), чувствительность которых в области 1270 нм по крайней мере на 2 порядка выше, чем у ФЭУ-83. Эти фотоумножители также требуют глубокого охлаждения. Принципиальная схема установок не отличается от разработанной нами. Однако из-за более высокой чувствительности они используются для анализа синглетного кислорода непосредственно в живых системах — клетках и тканях, а также для создания микроскопа, регистрирующего изображение генерирующих синглетный кислород компонентов клеток. Альтернативой таким установкам служат приборы на базе фотодиодов с малым фотокатодом, которые глубокого охлаждения не требуют, но работают в сочетании с надежными оптическими системами.

В докладе предполагается суммировать результаты последних исследований, выполненных с помощью указанных приборов и обсудить возможности их клинического применения. Автор благодарит РФФИ за поддержку работ в этом направлении.

#### **Литература**

1. Красновский А. А. мл. // Биофизика. — 1976. — Т. 21, вып. 4. — С. 748.
2. Красновский А. А. мл. // Биофизика. — 2004. — Т. 49, вып. 2. — С. 305.

*И. Ю. Кубасова<sup>1</sup>, К. В. Ермакова<sup>1</sup>, Л. Н. Борисова<sup>1</sup>, М. П. Киселева<sup>1</sup>, А. С. Халанский<sup>3</sup>, Г. А. Меерович<sup>4</sup>, З. С. Смирнова<sup>1</sup>, А. Ю. Барышников<sup>1</sup>, Е. А. Лукьянец<sup>2</sup>, Г. Н. Ворожцов<sup>2</sup>*

### **Изучение проницаемости гематоэнцефалического барьера для фотосенса спектрально-флюоресцентным методом у крыс с глиомой С6**

*<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*

*<sup>2</sup> ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Москва*

*<sup>3</sup> НИИ морфологии человека РАМН, Москва*

*<sup>4</sup> ЦЕНИ ИОФ им. А. М. Прохорова РАН, Москва*

**Введение.** Первичные злокачественные опухоли головного мозга составляют около 9 % всех новообразований у человека и представляют собой серьезную проблему из-за невозможности адекватного лечения. Полное хирургическое удаление глиомы связано с риском развития серьезных психоневрологических осложнений, а проведение послеоперационной лучевой и химиотерапии недостаточно эффективно. В последнее десятилетие широкое распространение получил новый метод диагностики и лечения глиом, основанный на селективном накоплении фотосенсибилизатора в опухолевой ткани. Для диагностики и лечения опухолей мозга большое значение имеет существование гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), в нормальном состоянии препятствующего поступлению в мозг терапевтических агентов. В опухолях I и II степени злокачественности ГЭБ, по-видимому, сохраняет свои функции. В процессе прогрессии опухоли отмечается нарушение проницаемости ГЭБ, особенно в активно растущей периферической зоне.

**Цель исследования.** Оценить динамику проницаемости ГЭБ для фотосенса в процессе развития глиомы С6 крыс.

**Материал и методы.** Глиому С6 перевивали интракраниально в область правого бокового желудочка мозга крыс Wistar по 200×10<sup>3</sup> опухолевых клеток в 10 мкл среды RPMI-1640. Фотосенс, синтезированный в ФГУП ГНЦ «НИОПИК» (0,2% раствор для инъекций), вводили внутривенно однократно в дозе 2 мг/кг с 3-го по 10-й день опыта. Уровень накопления препарата в опухоли и ткани мозга (противоположное полушарие мозга) оценивали спектрально-флюоресцентным методом с использованием спектроанализатора «ЛЭСА-БИОСПЕК» по интенсивности флюоресценции. Возбуждение флюоресценции осуществляли He-Ne-лазером с длиной волны 632,8 нм. О проницаемости ГЭБ судили по интенсивности флюоресценции в опухолевой и нормальной ткани, которую выражали в условных единицах (отношение интегральной интенсивности флюоресценции к интенсивности рассеянной лазерной линии) и определяли через 4 и 24 ч после введения препарата.

**Результаты.** Показано, что с ростом глиомы С6 интенсивность флюоресценции фотосенса в опухоли быстро нарастает. Интенсивность флюоресценции в опухоли через 4 ч после введения препарата на 4-й день опыта составляла 5,2 усл. ед., на 6-й день — 4,7 усл. ед., а к 10-му дню возрастала до 6,2 усл. ед. Более быстрый рост накопления фотосенса в опухоли наблюдался при оценке интенсивности флюоресценции через 24 ч после введения препарата: на 3-й день интенсивность флюоресценции составляла 3,7 усл. ед., на 6-й день — 5,9 усл. ед., а на 10-й день опыта — 6,7 усл. ед. В ткани мозга уровень накопления фотосенса был значительно ниже и интенсивность флюоресценции не превышала 1 усл. ед.

**Выводы.** Высокий уровень накопления фотосенса в глиоме С6 уже на 3-й день опыта позволяет сделать вывод о быстром росте опухоли и проницаемости ГЭБ для препарата на начальных стадиях ее развития. Полученные данные дают основание полагать, что применение фотосенса открывает новую возможность для фотодинамической терапии и диагностики опухолей головного мозга.

*Работа выполнена в рамках ФНТП «Разработка и практическое освоение в здравоохранении новых методов и средств профилактики, диагностики и лечения онкологических, инфекционных и других опасных заболеваний».*

*В. И. Кулаков<sup>1</sup>, И. А. Аполихина<sup>1</sup>, Е. Д. Денисова<sup>1</sup>, С. Г. Кузьмин<sup>2</sup>, Г. Н. Ворожцов<sup>2</sup>*

### **Возможности фотодинамической терапии с препаратом аласенс пациенток с папилломавирусной инфекцией гениталий**

<sup>1</sup> Кафедра акушерства, гинекологии и перинатологии ФПО ГОУ ВПО ММА им И.М. Сеченова, Москва

<sup>2</sup> ГУП МНКЦ «Интермедбиофизхим», Москва

**Введение.** Разработка и внедрение новых методов лечения заболеваний нижнего отдела генитального тракта, ассоциированных с вирусом папилломы человека (ВПЧ), является актуальной проблемой современной гинекологии ввиду распространенности данных заболеваний у женщин репродуктивного возраста с нереализованной репродуктивной функцией и ряда осложнений, возникающих после применения существующих методов лечения. Альтернативным и малоинвазивным методом лечения данной группы заболеваний является фотодинамическая терапия (ФДТ), нашедшая свое широкое применение в различных отраслях медицины.

**Цель исследования.** Оценка клинической эффективности препарата аласенс (5-аминолевулиновая кислота) при проведении ФДТ женщинам с заболеваниями вульвы, влагалища и шейки матки, ассоциированными с ВПЧ.

**Материал и методы.** В исследовании участвовало 25 пациенток, которые принимали препарат аласенс перорально в дозе 25 мг/кг массы тела с последующим сеансом ФДТ через 3–4 ч. Из них 19 пациенток с остроконечными кондиломами вульвы (76 %), 5 — с атипическим эпителием на шейке матки в виде уксусно-белого эпителия, мозаики, пунктации (20 %) и 1 пациентка с остроконечными кондиломами вульвы и атипическим эпителием на шейке матки в виде уксусно-белого эпителия (4 %). Контроль эффективности лечения проводили тестированием на ВПЧ с помощью полимеразной цепной реакции (оценивался противовирусный эффект), морфологического и кольпоскопического исследований (оценивалась регрессия патологических участков).

**Результаты.** В отношении заболеваний, ассоциированных с ВПЧ, полная регрессия была выявлена у 17 (68 %) пациенток, у 2 (8 %) пациенток — отсутствие эффекта, у 6 (24 %) пациенток — частичная регрессия, т. е. отмечено уменьшение размеров патологического участка на 50 %. Полный противовирусный эффект был зарегистрирован у 13 (52 %) пациенток, отсутствие противовирусного эффекта — у 12 (48 %) пациенток.

При приеме фотосенсибилизатора практически отсутствовали побочные реакции, лишь у 3 пациенток было отмечено незначительное головокружение, которое проходило самостоятельно в течение 1,5–2 ч. У 3 пациенток, которым ФДТ была проведена в летнее время года, имелись фототоксические реакции в виде гиперемии кожи лица и кистей рук, которые исчезли в течение 5 сут.

Также нами был отмечен отдаленный эффект от ФДТ у 5 пациенток (3 женщины — с остроконечными кондиломами вульвы и 2 — с атипическим эпителием на шейке матки), при оценке эффективности у которых через 3 мес. была зафиксирована частичная регрессия пораженных участков, а при осмотре через 5 мес. отмечена полная регрессия заболевания.

В целом отмечена хорошая переносимость сеансов ФДТ: только у 2 пациенток имелась значительная болезненность, у остальных было умеренное или слабое проявление болевого синдрома. После ФДТ болевые ощущения исчезали в течение 3–5 сут, что зависело от площади поражения.

Эпителизация тканей после сеансов ФДТ у 21 пациентки произошла в течение 7 сут, у 4 пациенток — в срок от 8 до 14 дней.

У большинства пациенток сохраняется полная регрессия патологических участков в течение 9–12 мес., только у 1 пациентки с остроконечными кондиломами вульвы был зарегистрирован рецидив заболевания.

**Выводы.** Таким образом, ФДТ приводит не только к излечению мультифокальных поражений, обеспечивая сохранность морфологической структуры нижнего отдела женской половой системы за счет избирательного накопления фотосенсибилизатора, но и обладает противовирусным эффектом. Нами не зафиксировано признаков системного фототоксического эффекта, локальный же был выражен незначительно. Наряду с этим не выявлены и серьезные нежелательные эффекты от ФДТ. Отсутствие повреждения неизмененной ткани во время ФДТ уменьшает болевые ощущения, а также сокращает продолжительность процесса заживления послеоперационной раны. ФДТ не вызывает образования эрозий и рубцов, при этом в 3 раза сокращается период заживления по сравнению с существующими

традиционными методами лечения (лазервапоризация, криодеструкция, радиохирургический метод).

По нашему глубокому убеждению, разработка и внедрение органосохраняющих методов лечения вирусассоциированных заболеваний нижнего генитального тракта является весьма актуальным и перспективным направлением в гинекологии.

*В. Г. Лихванцева<sup>1</sup>, Е. А. Оситова<sup>1</sup>, С. А. Шевчик<sup>1</sup>, В. Б. Лоценов<sup>2</sup>, С. Г. Кузьмин<sup>3</sup>, Г. Н. Ворожцов<sup>3</sup>*  
**Флюоресцентная диагностика опухолей органа зрения различной локализации с применением 5-аминолевулиновой кислоты**

<sup>1</sup> ГУ НИИ глазных болезней РАМН, Москва

<sup>2</sup> ЦЕНИ ИОФ РАН, Москва

<sup>3</sup> ГУП МНКЦ «Интермедбиофизхим», Москва

**Введение.** Опухоли век и конъюнктивы составляют 33 % среди всей офтальмоонкопатологии. Подавляющее большинство их представлено доброкачественными опухолями эпидермального и эпителиального генеза. Частота злокачественных новообразований достигает 30 %. Полиморфность их проявлений, схожесть симптомокомплекса с клиникой воспалительных заболеваний затрудняют дифференциальную диагностику (ДД). Существенным подспорьем в их диагностике служат компьютерная термография и радиоизотопные методы исследования. Возможности флюоресцентной диагностики (ФД) с применением 5-аминолевулиновой кислоты при опухолях этой локализации не изучены.

**Цель исследования.** Изучить возможности ФД с применением 5-аминолевулиновой кислоты в ДД доброкачественных и злокачественных опухолей век и конъюнктивы.

**Материал и методы.** ФД с 5-аминолевулиновой кислотой (аласенс производства ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Москва) применяли у 35 пациенток с опухолями различного генеза и локализации. Использовали два метода количественного анализа аутофлюоресценции: спектроскопию и поточечный анализ гистограмм фотофлюоресцентного изображения. Спектроскопию выполняли на лазерной электронно-спектральной установке ЛЭСА-01-БИОСПЕК (гелий-неоновый лазер,  $\lambda=632,8$  нм). Фотофлюоресцентное изображение получали с помощью видеофлюоресцентного устройства УФФ-675-01-БИОСПЕК (длина волны 675 нм, пропускание фильтров 425–570 нм; плотность мощности 40 мВт/см<sup>2</sup>). Интенсивность свечения сопоставляли с результатами гистоморфологических исследований.

**Результаты.** Независимо от типа опухоли пик флюоресценции протопорфирина IX (ППИХ) выявлялся к концу 2-го часа после приема аласенса. При этом злокачественные образования характеризовались достоверно большей амплитудой накопления ( $p<0,05$ ): их интенсивность свечения в 6–10 раз превышала аналогичные показатели при доброкачественных опухолях. Воспалительные процессы не сопровождалась усилением выработки ППИХ под воздействием приема аласенса.

**Выводы.** Таким образом, предварительные результаты свидетельствуют о возможностях применения ФД с аласенсом в дифференциальной диагностике опухолей органа зрения.

*В. Г. Лихванцева<sup>1</sup>, А. Ю. Федотов<sup>1</sup>, Л. М. Когония<sup>1</sup>, С. И. Харлан<sup>1</sup>, Т. А. Ручко<sup>1</sup>, О. Ю. Мерзлякова<sup>1</sup>, Э. Э. Казарян<sup>1</sup>, М. В. Будзинская<sup>1</sup>, С. А. Шевчик<sup>1</sup>, В. Б. Лоценов<sup>2</sup>, С. Г. Кузьмин<sup>3</sup>, Г. Н. Ворожцов<sup>3</sup>*

**Фотодинамическая терапия в комбинированном лечении внутриглазных метастазов рака грудной железы**

<sup>1</sup> ГУ НИИ глазных болезней РАМН, Москва

<sup>2</sup> ЦЕНИ ИОФ РАН, Москва

<sup>3</sup> ГУП МНКЦ «Интермедбиофизхим», Москва

**Введение.** Появление в арсенале онкологов новых эффективных химиотерапевтических препаратов привело к увеличению продолжительности жизни пациентов с метастазами рака в различных органах и системы. А вместе с удлинением их жизни чаще стали развиваться метастазы в тех органах, где их выявление ранее считалось редкостью. Среди пациентов с различными типами рака только у 10 % развиваются метастазы в глаз, при этом 37 % составляют метастазы рака молочной железы. В их лечении используют дистанци-

онную гамма- (ДГТ) и химиотерапию (ХТ). Высокая частота осложнений, связанных с ДГТ, заставляет скептически относиться к этому методу и обосновывает поиск новых методов лечения.

**Цель исследования.** Дать оценку возможности применения фотодинамической терапии с использованием фотосенса в комбинированном лечении метастазов рака грудной железы в хориоидею (МРХ).

**Материал и методы.** Наблюдали 4 пациентов с МРХ. В 2 случаях были поражены оба глаза (всего 6 глаз). В диагностике использовали традиционные обязательные (визио-метрия, пери- и тонометрия) и специальные офтальмологические методы исследования (флюоресцентная ангиография глазного дна, современные ультразвуковые и лазерные методы исследования глаза). ФДТ проводили лазерным излучением с длиной волны 675 нм. В качестве фотосенсибилизатора (ФС) использовали фотосенс из расчета 0,2 мг/кг массы тела больного. ФС вводили внутривенно. Облучали в одном режиме (плотность мощности — 250 мВт/см<sup>2</sup>, экспозиция — 5 мин). Сеансы облучения проводили ежедневно, доводя их количество до 10. В качестве химиотерапевтического агента применяли гемзар, который вводили из расчета 1000 мг/м<sup>2</sup>. Сроки наблюдения за пациентами составили от 3 мес. до 1,5 лет.

**Результаты.** В 4 глазах наблюдали положительную динамику с полной регрессией МРХ до формирования плоского хориоретинального рубца и восстановлением зрения с 0,1 до 0,5 и в 1 случае — до 0,7. Еще в 1 случае имела место неполная регрессия МРХ с 5,5 мм до 1,5 мм при общей ремиссии неопластического процесса. Экссудативная отслойка сетчатки и присутствие остаточной опухоли служили причиной низкого функционального результата у этой пациентки. У другого пациента с двусторонними метастазами на глазу с грубыми изменениями в сетчатке высоких функциональных результатов достичь не удалось.

**Выводы.** ФДТ в комбинации с ХТ эффективна при метастазах рака в хориоидею. Комбинированный метод лечения позволяет достичь высоких зрительных функций, что существенно повышает качество жизни этого тяжелого контингента больных.

*В. Г. Лихванцева<sup>1</sup>, О. Ю. Мерзлякова<sup>1</sup>, С. А. Шевчик<sup>1</sup>,  
В. Б. Лоценов<sup>2</sup>, С. Г. Кузьмин<sup>3</sup>, Г. Н. Ворожцов<sup>3</sup>*

#### **Фотодинамическая терапия в комбинированном лечении увеальных меланом**

<sup>1</sup> ГУ НИИ глазных болезней РАМН, Москва

<sup>2</sup> ЦЕНИ ИОФ РАН, Москва

<sup>3</sup> ГУП МНКЦ «Интермедбиофизхим», Москва

**Введение.** Эффективность современных органосохраняющих методов лечения увеальных меланом (УМ) зависит от ряда факторов. Степень пигментации и чувствительность опухоли к тому или иному виду лучевой терапии играют немаловажную роль. Известно, что основными механизмами цитодеструкции опухоли при термотерапии (ТТ) являются гипертермия опухоли в диапазоне 42–65 °С и объемная коагуляция новообразованных сосудов в ее строме. Биологическими механизмами фотодинамической терапии (ФДТ) признаны антиангиогенные и иммунные реакции. Совмещение механизмов цитодеструкции ТТ и ФДТ может потенцировать лечебный эффект комбинации методов.

**Цель исследования.** Изучить возможности ФДТ в комбинированном лечении увеальных меланом.

**Материал и методы.** ФДТ применяли в комбинации с ТТ на завершающем этапе лечения 5 пациентов с УМ (Т3N0M0) высотой от 5 до 7 мм. В качестве фотосенсибилизатора использовали отечественный препарат фталоцианинового ряда фотосенс, который вводили внутривенно из расчета 0,2 мг/мл массы тела больного. ФДТ проводили на отечественной лазерной установке с длиной волны 675 нм, адаптированной к щелевой лампе. Использовали плотность мощности 250 Дж/см<sup>2</sup>, экспозицию 5 мин, количество сеансов довели до 10. Термотерапию проводили транспупиллярно на диодном инфракрасном лазере с длиной волны 810 нм производства IRIDEX (США). Мощность лазерного воздействия варьировала от 250 до 1600 мВт и зависела от высоты опухоли, характера пигментации, близости к центральному отделу сетчатки. Экспозиция была величиной постоянной и составляла 60 с. Диаметр светового пятна лучевого воздействия в фокальной плоскости колебался от 600 до 3000 мкм, количество сеансов облучения — от 1 до 3.

**Результаты.** Во всех случаях 3 сеанса ТТ вызвали неполную регрессию опухоли. Толщина остаточного узла составляла до 1,5 мм. Сформировавшаяся плотная фиброзная ткань на его поверхности служила препятствием для последующих сеансов ТТ. ФДТ с фотосенсом снимала феномен лучевой резистентности и вносила дополнительный лечебный компонент. В последующие 2 мес. после ФДТ отмечали разрушение остаточной опухоли и формирование плоского хориоретинального рубца.

**Выводы.** ФДТ в комбинации с ТТ может существенно повысить эффективность и расширить возможности органосохраняющего лечения и показания к его применению при увеальных меланом.

#### *О. В. Макаров, А. З. Хашукоева, О. Б. Бороненкова* **Фотодитазин в лечении гиперпластических процессов эндометрия**

*Российский государственный медицинский университет, Москва*

**Введение.** В настоящее время одним из важных и стратегических направлений современной гинекологии является лечение гиперпластических процессов эндометрия, которые могут играть ключевую роль с точки зрения возможности развития злокачественной трансформации. Фотодинамическая терапия (ФДТ) — это метод лечения, основанный на селективном разрушении патологических клеток посредством взаимодействия накапливающегося в клетках фотосенсибилизатора (ФС) и поглощаемого им света.

**Цель исследования.** Изучение возможностей метода ФДТ при гиперпластических процессах эндометрия (ГПЭ).

**Материал и методы.** Фотодинамическая деструкция (ФД) эндометрия была выполнена 15 пациенткам в пери- и постменопаузе с морфологически верифицированным диагнозом железисто-кистозной гиперплазии эндометрия. Предоперационное обследование пациенток было стандартно и включало ультразвуковое исследование органов малого таза, гистероскопию с отдельным диагностическим выскабливанием и последующим гистологическим исследованием полученного материала, а также обследование шейки матки. На первом этапе ФДТ пациентке внутриматочно и/или внутривенно вводили раствор ФС фотодитазин (ООО «Вета-гранд»). Через 2–4 ч на слизистую оболочку матки воздействовали лазером на аппарате «Аткус-2» с длиной волны 662 нм, мощностью на выходе 1 Вт при помощи внутриматочного баллонного световода. Плотность энергии при проведении процедуры составила 300 Дж/см<sup>2</sup>, а удельная мощность 0,3 Вт/см<sup>2</sup>.

**Результаты.** С целью оценки ФДТ эндометрия проводилось ультразвуковое исследование срединных маточных структур через 1, 3 и 6 мес. после процедуры. Показатель М-эха через 3 и 6 мес. во всех наблюдениях составлял от 2 до 4 мм. Нами планируется оценка отдаленных результатов лечения через 12 мес. после операции.

**Выводы.** Безусловно, отсутствие отдаленных результатов исследования в настоящий момент не позволяет нам сформулировать окончательные выводы относительно долгосрочного и полного удаления эндометрия методом ФДТ с использованием ФС фотодитазин. Кроме того, требуют уточнения оптимальные условия расчетной дозы световой энергии, длительности и характера облучения для эффективной деструкции эндометрия. Однако дальнейшие исследования в этом направлении представляются нам перспективными и позволяют определить место ФДТ в лечении больных ГПЭ.

*Г. А. Меерович, Т. А. Савельева, В. Г. Жуков, В. П. Журавлева,  
Л. М. Коган, К. Г. Линьков, В. А. Сердобов, А. И. Волкова,  
В. Б. Лоценов*

#### **Источники света для ФДТ на основе мощных светодиодов**

*ЦЕНИ ИОФ им. А. М. Прохорова РАН, Москва*

**Введение.** Широкое распространение метода ФДТ делает актуальной задачу создания эффективных и недорогих источников света для облучения патологических очагов. Эти источники должны удовлетворять следующим требованиям:

— излучать в определенных спектральных диапазонах красной или ближней инфракрасной области спектра квазимонохроматический свет;

— иметь плотность мощности в области светового пятна в пределах 50–250 мВт/см<sup>2</sup>, оптимальную для большинства фотосенсибилизаторов;

— быть недорогими, компактными и простыми в эксплуатации. Современные светодиоды позволяют создать источники для ФДТ, удовлетворяющие этим требованиям.

**Результаты.** Нами разработан параметрический ряд светодиодных источников, включающий:

- светодиод, смонтированный на мощном хладопроводе;
- систему охлаждения, включающую радиатор и вентилятор;
- светосильную ахроматическую широкоугольную оптическую систему, обеспечивающую максимальный сбор излучения светодиодов на облучаемой поверхности;
- блоки питания светодиода и вентилятора.

Созданы источники света с излучением в спектральных диапазонах  $630\pm 10$ ,  $660\pm 10$ ,  $690\pm 10$ ,  $730\pm 10$  и  $800\pm 10$  нм, соответствующих рабочим областям фотосенсибилизаторов, разрешенных в России или проходящих испытания (аласенс, фотогем, хлориновые производные, фотосенс, фталосенс, новые длинноволновые производные фталоцианинов и бактериохлоринов).

Разработанные приборы обеспечивают плотность мощности до  $250 \text{ мВт/см}^2$  в световом пятне диаметром около 1 см, сфокусированном на расстоянии 15–25 мм от излучателя. Они имеют невысокую стоимость, долговечны и просты в эксплуатации и могут найти широкое применение как для фотодинамической терапии поверхностных патологических очагов, так и для других фототерапевтических процедур.

*И. Г. Меерович<sup>1</sup>, М. А. Грин<sup>2</sup>, Г. А. Меерович<sup>3</sup>,  
А. Г. Ципровский<sup>2</sup>, О. А. Масс<sup>2</sup>, С. В. Барканова<sup>4</sup>,  
Л. М. Борисова<sup>1</sup>, Н. А. Оборотова<sup>1</sup>, В. Б. Лоценов<sup>2</sup>,  
А. Ю. Барышников<sup>1</sup>, А. Ф. Миронов<sup>2</sup>*

#### **Новые фотосенсибилизаторы на основе производных бактериохлорофилла: предварительные результаты изучения *in vivo***

<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>2</sup> МИТХТ им. М. В. Ломоносова, Москва

<sup>3</sup> ЦЕНИ ИОФ им. А. М. Прохорова РАН, Москва

<sup>4</sup> ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Москва

**Введение.** Производные бактериохлорофилла являются перспективным классом соединений для создания фотосенсибилизаторов (ФС) ближнего инфракрасного диапазона. Такие ФС могут обеспечить эффективную фотодинамическую терапию (ФДТ) опухолей, в т. ч. расположенных достаточно глубоко под кожей или слизистой.

**Материал и методы.** В настоящей работе проводились исследования *in vivo* соединений: тринатриевой соли бактериохлорофилла-р (Bchl<sub>r</sub>), метилового эфира оксима N-метоксицикломида бактериохлорофилла-р (CIBchl<sub>r</sub>-NOMe) и тринатриевой соли 3-деацетил-3-( $\alpha$ -гидроксиэтил)бактериохлорофилла-р (Bchl<sub>r</sub>-OH). Исследования проводились на мышцах F<sub>1</sub> с опухолью Эрлиха, перевитой внутримышечно в область голени. Все ФС вводились внутривенно. Bchl<sub>r</sub> и Bchl<sub>r</sub>-OH вводились в водном растворе в дозе 20 и 5 мг/кг массы тела соответственно. CIBchl<sub>r</sub>-NOMe из-за его ограниченной растворимости в воде вводился в виде кремиформной дисперсии в дозе 1 мг/кг массы тела. Для исследования *in vivo* поглощения и флуоресценции ФС в тканях, а также оценки в динамике уровня и селективности накопления ФС в опухоли по отношению к коже использовались методы спектроскопии диффузного рассеяния и/или флуоресценции с использованием волоконного спектроанализатора «ЛЭСА». При ФДТ опухоли использовали излучение с плотностью мощности до  $300 \text{ мВт/см}^2$ , длина волны которого соответствовала спектральному максимуму поглощения введенного ФС. Эффективность воздействия оценивалась по торможению роста опухолей у мышей в группе после ФДТ по отношению к контрольной группе.

**Результаты.** Исследуемые ФС обладают значительным поглощением в области минимального собственного поглощения биологической ткани. Спектральные максимумы поглощения Bchl<sub>r</sub>, CIBchl<sub>r</sub>-NOMe и Bchl<sub>r</sub>-OH находятся в области 765, 795 и 735 нм соответственно. Все ФС быстро (менее чем за 2 сут) выводятся из кожи. Максимальная селективность накопления Bchl<sub>r</sub> в опухоли составляет 3–4, Bchl<sub>r</sub>-OH — 2–3. CIBchl<sub>r</sub>-NOMe обладает низкой селективностью. ФДТ проводилась через 10–50 мин после введения, когда накопление ФС в опухоли было близко к максимальному. Торможение роста опухоли при ФДТ с CIBchl<sub>r</sub>-NOMe и Bchl<sub>r</sub> пре-

вышало 70 и 80 % соответственно, при ФДТ с Bchl<sub>r</sub>-OH — достигало 60 %.

**Выводы.** Таким образом, предварительные исследования показывают достаточно высокую эффективность изучаемых соединений и потенциальную возможность использовать их в качестве фотосенсибилизаторов для ФДТ.

*А. В. Рябова<sup>1</sup>, В. И. Конов<sup>1</sup>, Л. В. Адамян<sup>2</sup>, Л. А. Беляева<sup>2</sup>,  
В. Б. Лоценов<sup>2</sup>*

#### **Разработка системы флуоресцентной визуализации клеточных культур**

<sup>1</sup> ЦЕНИ ИОФ им. А. М. Прохорова РАН, Москва

<sup>2</sup> Кафедры репродуктивной медицины и хирургии ФПДО МГМСУ, Москва

**Цель исследования.** Метод флуоресцентной диагностики активно применяется в онкологии на макро- и микроуровнях. В последнее время ведущие лаборатории, занимающиеся клеточными технологиями, столкнулись с проблемой туморогенного перерождения стволовых клеток в культурах. Для решения задачи флуоресцентной диагностики на клеточном уровне было решено использовать факт накопления фотосенсибилизаторов опухолевыми клетками, а для очистки культуры от злокачественных клеток — прецизионное облучение.

**Результаты.** Разработан и изготовлен макет монохроматического источника света на основе металлоалюидной лампы для проведения ФДТ и одновременного проведения диагностики в естественном и флуоресцентном свете. В ходе технических испытаний показано, что изготовленный образец монохроматического источника света является надежным устройством, пригодным для проведения ФДТ и ФД клеточных культур с поверхностью диаметром до 35 мм с контролируемой дозой облучения.

Разработан и изготовлен анализатор флуоресцентного изображения света для одновременного наблюдения и регистрации флуоресцентных и цветных изображений. В ходе технических испытаний показано, что изготовленный анализатор флуоресцентных изображений является надежным устройством, пригодным для проведения ФД клеточных культур в естественном и флуоресцентном свете. Разработана оптическая система регистрации флуоресцентного изображения с кратностью увеличения от 1 до 100.

Разработан метод регистрации и анализа флуоресцентных изображений модельных растворов. Определена чувствительность системы путем проведения испытаний на тест-образцах ПППХ различной концентрации. Система позволяет получить хорошо различимую флуоресценцию образца вплоть до концентрации ПППХ 0,1 мг/л, а в тонких слоях — 0,5 мг/л.

**Выводы.** На данном этапе разработан макет системы флуоресцентной визуализации клеточных культур, включающий в себя монохроматический источник света, микроскоп и систему регистрации и анализа флуоресцентных изображений.

*А. В. Рябова<sup>1</sup>, А. А. Стратонников<sup>1</sup>, Г. А. Меерович<sup>1</sup>,  
В. Б. Лоценов<sup>1</sup>, С. В. Барканова<sup>2</sup>, Е. А. Лукьянец<sup>2</sup>,  
В. М. Незримовский<sup>2</sup>*

#### **Особенности фармакокинетики гидрофобных фотосенсибилизаторов**

<sup>1</sup> ЦЕНИ ИОФ им. А. М. Прохорова РАН, Москва

<sup>2</sup> ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Москва

**Цель исследования.** В последнее время возрос интерес к использованию водонерастворимых фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии (ФДТ). Несмотря на то что гидрофильные вещества более удобны с точки зрения приготовления растворов для внутривенного введения, их способность транспорта сквозь клеточные мембраны к жизненно важным мишеням клетки довольно ограничена. Напротив, для липофильных веществ преодоление мембраны клетки может быть существенно облегчено, и они смогут достигнуть необходимых мишеней, в частности ядра, митохондрий, лизосом и др. Однако для внутривенного введения липофильных соединений их необходимо предварительно солиubilизировать с использованием поверхностно активных веществ (ПАВ). В данной работе рассматривается фармакокинетика некоторых алкил-фталоцианинов, солиubilизированных в растворе проксанола.

**Материал и методы.** Проводились исследования динамики накопления 3 безметалльных бутилфталочианинов, растворенных в 4% растворе проксанола, у мышей с привитыми опухолями после внутривенного введения. Были получены спектры поглощения и флюоресценции *in vivo* для оценки изменения концентрации препаратов в опухоли и нормальной мышечной ткани с течением времени после введения. Мы использовали дозы от 2 до 10 мг/кг и снимали спектры поглощения через разные промежутки времени в течение 15 дней после введения. Также часть животных была облучена лазером с длиной волны, равной 680 нм, и плотностью мощности 150 мВт/см<sup>2</sup> в течение 15 мин.

**Результаты.** Безметалльный тетра-3-трет. бутилфталочианин показал наилучшие результаты.

Установлено, что для этого препарата максимум накопления в опухоли достигается через сутки, когда достаточно препарата и в нормальной ткани (контраст 4 по поглощению). На 2-е сутки концентрация в опухоли падает на 30–50 %, при этом препарат значительно выводится из нормальных тканей (контраст по поглощению 10 для дозы 10 мг/кг и 20 для дозы 2 мг/кг). Далее в опухоли препарат фиксируется (не выводится), т. е. абсолютная экстинкция препарата в опухоли очень высока и визуально опухоли определяются как зеленые.

Динамика контрастности препарата по флюоресценции проходит через резкий максимум через сутки после введения и отлична от динамики контрастности препарата по поглощению. Флюоресценция препарата долго наблюдается в нормальных тканях и печени. В нормальной ткани интенсивность флюоресценции препарата через 15 сут и 2 сут отличается всего в 1,5–2 раза.

При облучении опухолей с препаратом наблюдалась резкая дезоксигенация.

**Выводы.** Динамика накопления безметалльного тетра-3-трет. бутилфталочианина в опухолях, возможно, лучшая из динамик накопления для существующих в настоящий момент водонерастворимых фотосенсибилизаторов.

*А. В. Рябова<sup>1</sup>, А. А. Стратонников<sup>1</sup>, В. Б. Лощенов<sup>1</sup>,  
Е. А. Лукьянец<sup>2</sup>*

### **Использование сенсорной системы «N-ацетил-3,7-дигидроксибензоксазин — пероксидаза» для детектирования молекул синглетного кислорода и перекиси водорода, образовавшихся при фотодинамической терапии**

*1 ЦЕНИ ИОФ им. А.М. Прохорова РАН, Москва*

*2 ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Москва*

**Цель исследования.** Изучение процессов тушения молекул синглетного кислорода и образования перекиси водорода при фотодинамической терапии в биологических средах.

**Материал и методы.** N-ацетил-3,7-дигидроксибензоксазин (A-Phe) (коммерческое название Amplex Red<sup>TM</sup>, Molecular Probes) широко используется в биохимических исследованиях для детекции перекиси водорода. В присутствии пероксидазы он реагирует с перекисью водорода, образуя сильно флюоресцирующий краситель — резорурфин.

В нашей работе мы применяли A-Phe для изучения образования синглетного кислорода и перекиси водорода, образующихся в процессе фотодинамической терапии (ФДТ) с сульфонируемым фталочианином алюминия (Фотосенс<sup>TM</sup>, «НИОПИК») в качестве фотосенсибилизатора (ФС).

**Результаты.** Было обнаружено, что A-Phe способен переходить в резорурфин вследствие реакций с участием синглетного кислорода во время облучения с ФС даже в отсутствие пероксидазы. Насколько нам известно, это первое экспериментальное наблюдение преобразования вещества из нефлюоресцирующей во флюоресцирующую форму под воздействием синглетного кислорода. При облучении флюоресцирующая форма (резорурфин) в процессе фотоблинка разрушается и флюоресценция пропадает. Динамическая кривая флюоресценции с момента включения облучения ведет себя так: сначала быстро растет от нулевого значения, проходит через ярко выраженный максимум, а затем падает вследствие фотоблинка. Более того, разгорание флюоресценции и динамика фотоблинка различаются в D<sub>2</sub>O и в H<sub>2</sub>O, что подтверждает участие в этих реакциях синглетного кислорода.

Мы также установили, что в присутствии пероксидазы во время ФДТ образование резорурфина идет еще быстрее, что может свидетельствовать о накоплении перекиси водорода. Вовлечение перекиси водорода в ФДТ может оказаться важным для механизмов разрушения и запуска апоптоза. Wentworth и соавт. наблюдали преобразование синглетного кислорода в перекись водорода в воде, катализируемое антителами, и предположили, что этот механизм может быть существенным в реакциях иммунного ответа. Мы также изучали образование перекиси водорода во время лазерного облучения в присутствии белков плазмы и ФС.

**Выводы.** Количество синглетного кислорода, генерируемое фотосенсибилизаторами (фотосенс, хлорин-Е6, фталочианины цинка) при облучении достаточно точно определяется по измерению интенсивности флюоресценции резорурфина в системе «D<sub>2</sub>O + пероксидаза + A-Phe».

Количественная оценка концентрации перекиси водорода по интенсивности флюоресценции резорурфина в системе «ФС + пероксидаза + A-Phe» показывает ее повышение при увеличении дозы облучения и уменьшение при переходе от альбумина к плазме, к D<sub>2</sub>O и к H<sub>2</sub>O соответственно.

По скорости образования резорурфина и по кинетике его фотоблинка можно количественно определять характер иммунологических реакций.

*В. В. Соколов<sup>1</sup>, В. И. Чиссов<sup>1</sup>, Е. В. Филоненко<sup>1</sup>,  
Р. И. Якубовская<sup>1</sup>, Е. А. Лукьянец<sup>2</sup>, Г. Н. Ворожцов<sup>2</sup>,  
С. Г. Кузьмин<sup>2</sup>*

### **Флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия с препаратами фотосенс и аласенс: опыт 11-летнего клинического применения**

*<sup>1</sup> МНИОИ им. П. А. Герцена, Москва*

*<sup>2</sup> ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Москва*

В МНИОИ им. П. А. Герцена методы флюоресцентной диагностики (ФД) и фотодинамической терапии (ФДТ) разрабатываются с 1980 г. Совместно с ГНЦ «НИОПИК» были синтезированы, прошли предклинические и клинические испытания препараты фотосенс и аласенс. Фотосенс — фотосенсибилизатор класса фталочианинов был применен впервые в мире в клинической практике в России в 1994 г. С 1999 г. в клинике используется препарат аласенс, синтезированный на основе 5-аминолевулиновой кислоты, предшественника эндогенного фотосенсибилизатора протопорфирина IX (ППИХ).

С 1994 по 2005 г. проведено 3740 сеансов ФД и ФДТ у 1003 пациентов для диагностики и лечения опухолей кожи, головы и шеи, верхних дыхательных путей, плевры, пищеварительного тракта, мочеполовой системы и др. ФД с препаратом аласенс выполнена 335 пациентам. Во время сеансов диагностики мы применяем сочетание визуального определения очагов повышенного накопления аласенс-индуцированного ППИХ с использованием флюоресцентных эндоскопов фирмы «Карл Шторц» (Германия) и количественной оценки уровня накопления ППИХ путем локальной флюоресцентной спектроскопии с использованием диагностической установки «Спектр» фирмы «Спектр-Кластер» (Россия). В результате проведенного обследования скрытые очаги первично-множественного синхронного рака кожи диагностированы у 20 % больных, рака мочевого пузыря — у 5 %, рака шейки матки и эндометрия — у 8 %, рака верхних дыхательных путей — у 12 %. ФДТ в сочетании с ФД с фотосенсибилизатором фотосенс проведена 448 больным, с препаратом аласенс — 220. Для ФДТ мы используем отечественные диодные, газовые и твердотельные лазерные установки. ФДТ с препаратом аласенс применяли у больных с дисплазией и преинвазивным раком. ФДТ с фотосенсом проводили в группе пациентов с начальным раком с целью полного удаления опухоли и в группе больных с метнораспространенными, в т. ч. стенозирующими, опухолями, а также у больных с метастатическими и рецидивными опухолями, резистентными к химиолучевой терапии с паллиативной целью для реканализации, уменьшения объема новообразования, гемостаза, уменьшения болевого синдрома.

Для повышения эффективности лечения в институте разработаны методики пролонгированной ФДТ (многокурсовая ФДТ и ФДТ с фракционированием дозы света) и сочетанного или последовательного применения ФДТ с лучевой, химиотерапией или лазер-



но-индуцированной гипертермией. Наилучшие результаты лечения получены в группе больных поверхностными формами рака: в зависимости от локализации число полных регрессий опухолей составило от 67 до 95 %. Применение ФДТ инкурабельным по местной распространенности опухоли больным позволило в большинстве случаев добиться улучшения качества их жизни и стабилизации опухолевого процесса.

*О. И. Трушина, Е. Г. Новикова, В. В. Соколов, Е. В. Филоненко*  
**Фотодинамическая терапия в лечении генитальной папилломавирусной инфекции**

*МНИОИ им. П. А. Герцена, Москва*

**Цель исследования.** Разработка методики фотодинамической терапии (ФДТ) вирусассоциированных заболеваний в гинекологии.

**Материал и методы.** Фотодинамическая терапия шейки матки выполнена 35 больным в возрасте от 23 до 65 лет,  $\frac{2}{3}$  из которых находились в репродуктивном возрасте. При комплексном обследовании с применением методов клинической, эндоскопической, флюоресцентной и морфологической диагностики у 22 (62,9 %) из 35 больных диагностирована дисплазия тяжелой степени (1-я группа), у 9 (5,7 %) — дисплазия умеренной степени (2-я группа) и в 4 случаях (5,7 %) — дисплазия легкой степени и фоновые заболевания шейки матки (3-я группа). При вирусологическом исследовании женщин всех групп методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) у 31 (88,5 %) из них установлено инфицирование онкогенными генотипами высокого риска (16/18) папилломавирусной инфекции (ПВИ): в 1-й группе — у 20 (90,9 %) пациенток, во 2-й группе — у 7 (77,8 %) и в 3-й — у 4 (100 %).

Сеанс ФДТ проводился через 24 ч после внутривенного введения фотосенсибилизатора фотосенс в дозе 0,3 мг/кг массы тела больно-го. В качестве источника оптического излучения для проведения ФДТ использовали лазерную установку «Кристалл» (длина волны 670 нм). Плотность энергии лазерного излучения составляла 100–300 Дж/см<sup>2</sup>.

Лазерное облучение цервикального канала осуществлялось с использованием кварцевого световода с цилиндрическим диффузором длиной 3 см, влагалищной порции шейки матки — микролинзой с диаметром светового пятна 1–2 см в виде полипозиционного облучения патологически измененных участков слизистой оболочки.

**Результаты.** К настоящему времени во всех клинических наблюдениях через 1–3–6 мес. после лечения проведено вирусологическое обследование методом ПЦР. Полная эрадикация ПВИ установлена у 27 (88 %) больных: в 1-й группе у 18 (90 %) пациенток, во 2-й — у 5 (77,8 %), в 3-й — во всех случаях (100 %).

**Выводы.** Полученные результаты эффективности ФДТ с использованием фотосенсибилизатора фотосенс свидетельствуют о перспективности его дальнейшего изучения и целесообразности продолжения клинических испытаний в рамках противовирусного лечения.

*А. З. Хацукоева, С. А. Рехвиашвили, О. Б. Бороненкова*  
**Использование фотодитазина в лечении патологии шейки матки**

*Российский государственный медицинский университет, Москва*

**Цель исследования.** Проблема лечения фоновых и предраковых заболеваний шейки матки остается актуальной ввиду высокой показателем заболеваемости у пациенток репродуктивного периода. Фотодинамическая терапия (ФДТ) — это метод, основанный на селективном накоплении фотосенсибилизатора (ФС) в патологической ткани с последующим развитием в ней фотохимических реакций под воздействием лазерного облучения. В настоящее время ФДТ широко используется в терапии диспластических процессов шейки матки, а также рака шейки матки, однако эффективность фотодинамической деструкции (ФД) в лечении фоновых и предраковых заболеваний шейки матки изучена недостаточно.

**Материал и методы.** ФДТ была проведена 72 больным с фоновыми и предраковыми заболеваниями шейки матки в возрасте от 19 до 67 лет. Из них у 37 (51,38 %) пациенток диагностирована эктопия шейки матки, у 14 (19,4 %) — лейкоплакия, у 7 (9,72 %) — эндометриоз, у 9 (12,5 %) — дисплазия шейки матки I–II степени и у 5 (6,9 %) — эктропион на фоне незначительной рубцовой деформации шейки матки. Лазерное воздействие осуществлялось через 2 ч пос-

ле местной аппликации ФС на экзоцервикс или внутривенного введения ФС фотодитазин (ООО «Вета-гранд») при помощи полупроводникового лазерного аппарата «Аткус-2». Длина волны при этом составила 662 нм, при плотности энергии 80–250 Дж/см<sup>2</sup>, мощности лазерного излучения на выходе 1 Вт и времени воздействия от 8 до 20 мин.

**Результаты.** При наблюдении за репаративными процессами было отмечено начало краевой эпителизации на 5–8-е сутки, в то время, как полная эпителизация выявлена через 4–8 нед. Эффективность методики оценивалась на основании данных кольпоскопии и цитологического исследования и составила, по нашим наблюдениям, 88,9 %. Побочные эффекты наблюдались у 11,1 % больных в послеоперационном периоде и заключались в неполной эпителизации шейки матки.

**Выводы.** Таким образом, изученные наблюдения свидетельствуют, что данный метод лечения с использованием ФС фотодитазин является высокоэффективным способом терапии фоновых и предраковых заболеваний шейки матки, позволяющим селективно воздействовать на патологический очаг, не вызывая рубцовых изменений шейки матки и сохраняя ее анатомическую целостность. Следовательно, это средство выбора при лечении патологии шейки матки, предпочтительное у пациенток репродуктивного возраста.

*Д. М. Язудаев<sup>1</sup>, А. Е. Сорокатый<sup>1</sup>, А. В. Гейниц<sup>2</sup>*  
**Комбинированная фотодинамическая терапия поверхностного рака мочевого пузыря**

<sup>1</sup> *Городская клиническая больница № 51, Москва*

<sup>2</sup> *ФГУ Государственный научный центр лазерной медицины Росздрава, Москва*

Рак мочевого пузыря — одно из самых распространенных (после рака предстательной железы) онкологических заболеваний в урологии.

Одним из современных малоинвазивных методов лечения данного заболевания является фотодинамическая терапия (ФДТ). Рак мочевого пузыря необходимо рассматривать как заболевание всей слизистой оболочки, а не ее локальное поражение. Для улучшения результатов лечения нами было предложено проведение комбинированной ФДТ.

Суть данного способа заключается не только в фотодинамическом воздействии на саму опухоль, но и в последующем лазерном облучении всей слизистой оболочки мочевого пузыря с помощью светового волокна с цилиндрическим диффузором, введенным в силиконовом баллоне.

В настоящее время мы можем привести обработанные данные 13 пациентов, которым была произведена ФДТ комбинированным способом при поверхностном раке мочевого пузыря; срок наблюдения — 3 года. Средний возраст пациентов составил 68,2 лет, средний койко-день — 9 дней. При контрольной цистоскопии после проведения ФДТ через неделю и месяц у всех пациентов мы отметили фотодеструкцию опухоли и отсутствие рецидивов в течение 1-го года наблюдения. 3-летняя безрецидивная выживаемость составила 84,7 %. Таким образом, ФДТ поверхностного рака мочевого пузыря является перспективным методом его лечения и профилактики рецидивов.

*И. В. Ярцева, Л. Г. Гатинская, Н. А. Дмитричева, Н. А. Машалова, Б. С. Кикоть*  
**Количественное определение тиосенса**

*ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*

Тиосенс — тетра-3-фенилтиофталоцианин алюминия гидроксида [3-(PhS)4-PcAlOH] — новое комплексное соединение алюминия класса тиофталоцианинов, полученное в ФГУП ГНЦ «НИОПИК» и предназначенное для фотодинамической терапии опухолей.

Одной из главных задач стандартизации новой субстанции является выбор метода количественного определения содержания основного действующего вещества. Наиболее оптимальным вариантом прямого количественного определения тиосенса является дающий надежные результаты метод, основанный на определении серы сожжением образца в токе кислорода по Шенггеру в соответствии с ГФ XI. Следует, однако, отметить, что в случае тиосенса этот метод неспецифичен в отношении исходного вещества — тетра-3-фенилтиофталоцианина алюминия хлорида, т. к. оба соединения имеют очень близкие молярные массы и содержат в процентном отно-

шении практически одинаковое количество серы (12,94 и 12,70 % соответственно).

Для контроля за содержанием в тиосенсе тетра-3-фенилтиофталоцианина алюминия хлорида мы предложили дополнительно определять содержание хлора в исследуемых образцах тиосенса также сожжением в токе кислорода. Определение хлора в искусственных составленных модельных смесях, содержащих оба вещества в известных и разных соотношениях, показало, что в образцах серий тиосенса, где хлор определялся в количествах выше 0,5 %, со-

держание тетра-3-фенилтиофталоцианина алюминия хлорида составляло более 5,0 %.

**Выводы.** В результате проделанной работы было четко показано, что содержание в тиосенсе 0,5 % хлора является критическим, а также то, что этот параметр (содержание хлора) может служить критерием чистоты препарата.

*Работа поддержана Правительством Москвы. Авторы благодарят Г. Н. Ворожцова, Е. А. Лукьянца и В. М. Деркачеву за сотрудничество и предоставленные для исследования образцы тиосенса.*

## ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ

Н. В. Андропова<sup>1</sup>, Е. М. Трещалина<sup>1</sup>, Д. В. Филоненко<sup>1</sup>,  
А. Л. Николаев<sup>2</sup>, В. Е. Божевольнов<sup>2</sup>, И. М. Трещалин<sup>1</sup>,  
О. Л. Калия<sup>3</sup>, Г. Н. Ворожцов<sup>3</sup>

**Влияние ультразвука и сонодинамической терапии на метастазирование**

<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>2</sup> МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

<sup>3</sup> ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Москва

**Введение.** Известно, что под влиянием локального ультразвукового воздействия (УЗ) происходит усиление цитотоксичности различных противоопухолевых агентов (сонодинамическое действие, СДТ) и химических веществ (соносенсибилизация). Нами показано существенное повреждение опухоли и ее сосудистого русла при СДТ с использованием адриабластина (Адр), карбоплатина (Карбо) и соносенсибилизатора терафтала (ТФ), что не исключает усиления гематогенного метастазирования.

**Цель исследования.** Изучение способности к метастазированию меланомы В16 под влиянием УЗ и СДТ с использованием Адр, Карбо и ТФ.

**Материал и методы.** Мышам ( $n=8-10$ ) BDF<sub>1</sub> с развившейся внутримышечно меланомой В16 площадью более 1 см<sup>2</sup> проводили терапию УЗ, Адр+Карбо, ТФ+УЗ и Адр+Карбо+ТФ+УЗ. УЗ на установке «УСДТ-м» выполняли в течение 10 мин с 2 полей под водой при температуре 36 °С, интенсивность на 1-е поле — 0,88 МГц (1,0 Вт/см<sup>2</sup>), на 2-е поле — 2,64 МГц (2,0 Вт/см<sup>2</sup>). Препараты вводили однократно до УЗ в разные сроки: Карбо и ТФ — в дозе 30 мг/кг в/в, Адр — в дозе 4 мг/кг в/в. Группа контроля — мыши с В16 без специфического воздействия. Лечение проводили на 7-е сутки после перевивки, на следующий день опухоли удаляли. В момент гибели первой мыши в контроле от метастазов всех мышей умерщвляли, выделяли и взвешивали легкие, после чего рассчитывали соотношение средней массы легких ( $m_{ср}$ ) леченных и здоровых мышей (легочный коэффициент, ЛК). Показателем метастазирования был ЛК в группе контроля. Данные обрабатывали статистически, используя доверительные интервалы для средних сравниваемых величин по стандартному методу Стьюдента в модификации Р. Б. Стрелкова.

**Результаты.** У здоровых мышей  $m_{ср}$  составляла 172 мг, в группе контроля на 27 сут метастазирование в легкие — 100 %,  $m_{ср}=923$  мг, ЛК=5,4. В группе УЗ метастазирование 100 %,  $m_{ср}=729$  мг, ЛК=4,2. В группе Адр+Карбо метастазирование 100 %,  $m_{ср}=287$  мг ( $p<0,05$ ), ЛК=1,7. В группе ТФ+УЗ метастазирование 100 %,  $m_{ср}=783$  мг, ЛК=4,6. В группе Адр+Карбо+ТФ+УЗ метастазирование 100 %,  $m_{ср}=196$  мг ( $p<0,05$ ), ЛК=1,1. Побочные эффекты при УЗ и СДТ проявлялись слабым кратковременным отеком лапки без гибели мышей.

**Выводы.** УЗ на установке «УСДТ-м» и СДТ с адриабластином, карбоплатином и терафталом не вызывает стимуляции метастазирования в/м меланомы В16 в легкие (первичный узел удален) и хорошо переносится животными. В результате лечения масса легких с метастазами при комбинированной химиотерапии или СДТ с использованием терафтала достоверно уменьшалась в 3,2–4,7 раза.

Г. И. Борисов, Р. И. Кондратенко

**Полуэмпирическая оценка характеристик терапевтических пучков нейтронов для <sup>10</sup>B-НЗТ**

ФГУ РНЦ «Курчатовский институт», Москва

Для установления зависимостей между физическими характеристиками пучков нейтронов для <sup>10</sup>B-НЗТ ядерными и атомными данными и критериями, на основании которых проводятся расчеты, предлагается такая интегральная характеристика пространственных распределений потоков медленных нейтронов в облучаемом объекте, как эффективная масса. В ней происходит столько же ядерных реакций, сколько во всем облучаемом объекте, при этом число реакций в единичной массе постоянно и равно максимальному значению в облучаемом объекте. Эффективная масса — это экспериментально измеряемая величина.

Таблица 1

Фильтр	Cd	Fe+Al+S	<sup>10</sup> B
Эффективная масса, $m_{эфф.мин.}$ , г	240	380	460
$\Phi_{теп.поверхности}/\Phi_{теп.макс.}$ отн. ед.	0,43	0,27	0,31

Средняя энергия, создаваемая одним нейтроном  $E_n$ , вычисляется по формуле:

$$E_n = \frac{k_H \sigma_H E_{\gamma,H} I_{\gamma,H} \delta_{\gamma,H} + k_N \sigma_N E_{p,N} + k_{B^{10}} \sigma_{B^{10}} (E_{\alpha} + E_{Li^7})}{\frac{k_H \sigma_H}{A_H} + \frac{k_N \sigma_N}{A_N} + \frac{k_{B^{10}} \sigma_{B^{10}}}{A_{B^{10}}}}, \quad (1)$$

где обозначения физических величин соответствуют общепринятым в ядерной физике:  $k$  — концентрации элементов,  $\delta_{\gamma,H}$  — доля поглощения энергии фотонов из реакции радиационного захвата нейтронов водородом, которая определяется значением  $m_{эфф.}$  в соответствии с:

$$\delta_{\gamma,H} = \mu_{эн,\gamma,H} L_{ср.}, \quad L_{ср.} = \frac{3\pi R_{m,эфф.}}{8}; \quad \frac{4\pi R_{m,эфф.}^3}{3\rho_{матр}} = m_{эфф.} \quad (2), (3), (4)$$

Число тепловых нейтронов  $N_{тепл}$  и число промежуточных нейтронов  $N_{пр.}$ , необходимое для создания поглощенной дозы  $D$  в облучаемом объекте, рассчитываются из выражений:

$$N_{тепл.} = \frac{D m_{эфф.}}{1,6 \cdot 10^6 E_n}; \quad N_{пр.} = \frac{N_{тепл.}}{1-\beta}, \quad (5), (6)$$

где  $\beta_{пр.} \approx 0,35$  — альbedo облучаемого объекта,  $1,6 \cdot 10^{-16}$  — переводной коэффициент кэВ в Дж.

Откуда дозовая характеристика или керма быстрых нейтронов (что далеко не одно то же)  $Q_{пр.}$  определяется уравнением:

$$Q_{пр.} = \frac{3 \cdot 1,6 \cdot 10^{-16} K \cdot E_n (1 - \beta) r_{пучка}^2}{4 R_{эфф.}^3 \rho_{ткани}} \quad (7)$$

где  $K$  — отношение кермы быстрых нейтронов (по нашему мнению) к максимальному значению поглощенной дозы нейтронов в облучаемом объекте.

В приведенных ниже результатах расчетов облучаемый объект считается гомогенным, хотя это далеко не так, поскольку препарат накапливается преимущественно в клетках опухоли. Учитывая, что по данным табл. 1  $\Phi_{теп.поверхности} / \Phi_{теп.макс.} = 0,43$ ,  $K = 0,4$ . При этом предполагается, что суммарная поглощенная доза на поверхности равна максимальной дозе в облучаемом объекте, на долю дозы фотонного излучения приходится 0,15 от полной поглощенной дозы на поверхности. Далее  $r_{пучка} = R_{эфф.мин.}$ ;  $m_{эфф.} = 4m_{эфф.мин.}$ , при этом предполагается, что  $m_{эфф.}$  слабо уменьшается с увеличением  $k_B$ .

Таблица 2

Концентрация $^{10}\text{B}$ , $k_{B^{10}}$ , ppm	0	15	30	60
Парциальный состав ядерных реакций, %	N — 89 N — 11 $^{10}\text{B}$ — 0	N — 76,7 N — 9,7 $^{10}\text{B}$ — 13,6	N — 67,5 N — 8,5 $^{10}\text{B}$ — 24,0	N — 54,5 N — 7,0 $^{10}\text{B}$ — 38,5
Парциальный состав поглощенной дозы, %	N — 75,6 N — 24,4 $^{10}\text{B}$ — 0	N — 33,5 N — 10,8 $^{10}\text{B}$ — 55,7	N — 21,5 N — 6,9 $^{10}\text{B}$ — 71,6	N — 12,5 N — 4,1 $^{10}\text{B}$ — 83,4
Средняя энергия, создаваемая одним нейтроном, $E_n$ кэВ	287	560	768	1064
Керма быстрых нейтронов, $Q_{пр.}$ , Гр·см <sup>2</sup>	$5,5 \cdot 10^{-13}$	$10,6 \cdot 10^{-13}$	$14,6 \cdot 10^{-13}$	$20,2 \cdot 10^{-13}$
$\Phi_{пр.}$ (см <sup>2</sup> ·с <sup>-1</sup> ) при мощности поглощенной дозы 30 Гр/ч	$1,9 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^9$	$7,2 \cdot 10^8$	$5,2 \cdot 10^8$

*А. В. Борсуков, Е. С. Коваленко, А. Н. Евдокимов*  
**Экспериментальное обоснование выбора режима электрохимического лизиса злокачественных опухолей**

*ПНИЛ «Ультразвуковые исследования и малоинвазивные технологии» Смоленской государственной медицинской академии  
Смоленский областной институт патологии*

**Цель исследования.** 1. Разработать модель особенностей реакции опухолевой ткани во время электрохимического лизиса (ЭХЛ) в зависимости от параметров лизиса. 2. Проверить работоспособность модели в эксперименте.

**Материал и методы.** Было проведено 85 сеансов ЭХЛ 36 макропрепаратов опухолей желудочно-кишечного тракта, удаленных во время радикального хирургического лечения (недифференцированный рак — 7, низкодифференцированная аденокарцинома (АК) — 10, умереннодифференцированная АК — 14, высокодифференцированная АК — 1, плоскоклеточный рак — 1, коллоидный рак — 3). Используемые параметры режима ЭХЛ: сила тока — 50, 75, 90 мА, время воздействия — 20, 40 мин, расстояние между электродами — 10, 15 мм. Для проведения ЭХЛ был использован аппарат ЕСУ-300 фирмы SOERING. Математические модели, описывающие зависимость диаметра макроскопически измененной ткани вокруг электродов и диаметр зоны неизменной ткани между электродами, были получены путем множественного регрессионного анализа. Для проверки работоспособности вышеуказанных моделей была привита пепериваемая опухоль PC-I (альвеолярноклеточный рак) 5 белым беспородным крысам самцам с выполнением ЭХЛ через месяц. После

ЭХЛ была проведена немедленная визуальная и гистологическая оценка опухолевого узла, капсулы и окружающих тканей.

**Результаты.** Характер морфологических изменений опухолевой ткани при ЭХЛ представлен 4 степенями деструкции. На диаметр зоны деструктивно-измененной ткани вокруг электродов значимое влияние оказывает сила тока, однако влияния времени воздействия и расстояния между электродами выявлено не было. Проведение ЭХЛ опухолевых узлов с учетом полученных зависимостей приводит к некрозу 50 % ткани узла, остальные 50 % повреждений представлены выраженной деструкцией опухолевых тканей.

**Выводы.** 1. Варианты морфологических изменений опухолевой ткани после ЭХЛ оптимальны для оценки в виде 4 степеней деструкции. 2. Разработанные математические модели описывают 90–95 % выборочных данных. 3. Основным фактором, влияющим на эффект ЭХЛ, является сила тока. 4. Для экспериментального обоснования оптимального режима ЭХЛ опухолей необходима оценка отсроченных и отдаленных результатов ЭХЛ, проведенного с учетом выявленных зависимостей.

*В. А. Братцев<sup>1</sup>, Дж. Х. Моррис<sup>2</sup>, Э. Л. Гуркова<sup>1</sup>,  
П. А. Стороженко<sup>1</sup>*

**Синтез препарата BSH из  $^{10}\text{B}_{12}\text{H}_{12}^{2-}$  и производного тиомочевины  $[(\text{NH}_2)_2\text{CS}]_2^{2+}$ . Получение лекарственной формы  $^{10}\text{BSH}$  для БНЗТ**

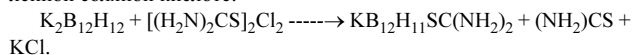
<sup>1</sup> ГНЦ ГНИИХТЭОС, Москва

<sup>2</sup> Strathclyde University, Глазго, Великобритания

Лечение резистентных злокачественных опухолей, в особенности опухолей головного мозга, осуществляется методом нейтронозахватной терапии (НЗТ) с использованием борсодержащих препаратов. Наиболее эффективным является препарат BSH —  $^{10}\text{B}$ -меркаптододекаборат натрия, используемый в НЗТ в США, Европе, Японии.

Цель работы — создание нового эффективного метода синтеза препарата BSH, отличающегося применением легкодоступных и дешевых исходных соединений серы, в данном случае — тиомочевины  $(\text{NH}_2)_2\text{CS}$ .

По аналогии с роданом  $(\text{NCS})_2$ , который подобно галогенам  $\text{Hal}_2$  замещает атом водорода в додекаборате  $(\text{B}_{12}\text{H}_{12}^{2-})$  с образованием родандодекабората  $\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SCN}^{2-}$  [1–3], мы изучили возможность введения атома серы в додекаборат с помощью производного тиомочевины — дихлорида формамидиндисульфида  $[(\text{H}_2\text{N})_2\text{CS}]_2\text{Cl}_2$ , который легко образуется при окислении тиомочевины бромом в разбавленной соляной кислоте:



Дикатион формамидиндисульфида при нагревании в солянокислом водном растворе реагирует с анионом додекабората с образованием внутренней тиурониевой соли  $\text{KB}_{12}\text{H}_{11}\text{SC}(\text{NH}_2)_2$ , содержащей  $\text{B}-\text{S}$ -связь.

При щелочном гидролизе тиурониевая группа дает меркаптогруппу  $\text{SH}$ , связанную с бором, т. е. образуется меркаптододекаборат  $\text{KB}_{12}\text{H}_{11}\text{SC}(\text{NH}_2)_2 + \text{KOH} \rightarrow \text{K}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH} + (\text{NH}_2)_2\text{CO}$ , который мы выделяли в виде цезиевой соли  $\text{Cs}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$  и очищали перекристаллизацией из водного этанола.

В связи с тем, что для НЗТ необходим препарат, максимально обогащенный по  $^{10}\text{B}$ , все стадии его синтеза мы отработали с применением додекабората  $^{10}\text{B}_{12}\text{H}_{12}^{2-}$ , обогащенного по  $^{10}\text{B}$  на более чем 99 %.  $^{10}\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}^{2-}$ , получаемый по приведенным выше реакциям в виде цезиевой соли, превращен в натриевую с помощью катионного обмена. Водный раствор натривой соли  $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$  пропустили через бактериальный фильтр, расфасовывали по медицинским флаконам в расчетном количестве 200–300 мг  $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$  на флакон. Раствор подвергали лиофильной сушке. Полученную лекарственную форму препарата  $^{10}\text{BSH}$  стерилизовали термически (120 °С и 1 атм) и поставляли для обеспечения лабораторных и клинических испытаний НЗТ в ГУ РОНЦ РАМН (Москва) и Институт медрadiологии (Обнинск).

**Литература**

1. Brattsev V., Morris J. Proc. IMEBORON-9, Heidelberg, 1996. — P. 167.

2. Brattsev V., Morris J. *Advances in NCT* // Elsevier. — 1997. — Vol. II. — P. 51–55.

3. Srebny H., Preetz W. // *Z. anorg. allg. Chem.* — 1984. — Vol. 513. — P. 7–14.

*Н. А. Кайдан, С. Н. Корякин, С. Е. Ульяненко, В. А. Ядровская*

**Целенаправленное изменение фармакокинетики меркаптододекабората натрия, меченного  $^{131}\text{I}$ , посредством воздействия вазоактивных препаратов**  
*Медицинский радиологический научный центр РАМН, Обнинск*

**Цель исследования.** Увеличить накопление борсодержащего соединения в опухоли путем применения вазоактивных средств на основе изучения влияния сосудорасширяющего (дибазол) и сосудосуживающего (мезатон) препаратов на распределение в меланоме В16 и окружающих ее здоровых тканях мышей меркаптододекабората натрия ( $^{131}\text{I}$ -BSH).

**Материал и методы.** В исследованиях использовали мышей-самцов линии  $\text{C}_{57}\text{B}_{1/6}$  массой 20–22 г с имплантированной под кожу бедра меланомой В16, меченный  $\gamma$ -излучающим изотопом  $^{131}\text{I}$  меркаптододекаборат натрия —  $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$  ( $^{131}\text{I}$ -BSH). Дибазол вводили внутривенно (0,5 мл) в концентрации 12,5 мг/кг массы животного через 10 мин после введения  $^{131}\text{I}$ -BSH, мезатон в концентрации 2 мг/кг в том же объеме — через 30 мин. Радиоактивность биологического материала измеряли в разные сроки после введения соединения с помощью колодезного сцинтилляционного счетчика.

**Результаты.** Изучение влияния дибазола и мезатона на распределение в меланоме В16 и окружающих тканях мышей  $^{131}\text{I}$ -BSH показало, что введение этих соединений не приводит к существенному изменению накопления меченого соединения в исследуемых тканях. При применении мезатона следует отметить тенденцию к увеличению по сравнению с контролем накопления  $^{131}\text{I}$ -BSH через 9 ч после введения как в опухоли, так и в окружающих ее тканях. При использовании дибазола в качестве модифицирующего агента отмечено увеличение соотношения между накоплением  $^{131}\text{I}$ -BSH в опухоли и окружающих тканях (кожа, мышца) через 9 ч после введения  $^{131}\text{I}$ -BSH и опухоль/кровь через 18 ч. Данное обстоятельство свидетельствует о целесообразности применения дибазола для повышения градиента накопления борсодержащего соединения опухоль/окружающие ткани при проведении нейтронозахватной терапии.

**Выводы.** Изучение влияния на накопление в опухоли и окружающих тканях  $^{131}\text{I}$ -BSH 2 сердечно-сосудистых препаратов, оказывающих сосудорасширяющий (дибазол) и сосудосуживающий (мезатон) эффект, показало, что действие дибазола на увеличение градиента опухоль/окружающая ткань более выражено по сравнению с мезатоном. Полученные результаты позволяют считать перспективными исследования по использованию дибазола для решения одной из важных задач нейтронозахватной терапии — управления накоплением борсодержащего препарата в опухолевой и окружающих ее тканях.

*Е. С. Коваленко*

**Клиническое применение электрического сопротивления ткани как оценочного признака эффективности электрохимического лизиса злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта**

*ПНИЛ «Ультразвуковые исследования и малоинвазивные технологии» Смоленской медицинской академии*

**Цель исследования.** Изучить характер изменения электрического сопротивления опухолевой ткани во время ЭХЛ как возможного признака оценки эффективности лизиса.

**Материал и методы.** Было проведено 34 сеанса ЭХЛ 11 макропрепаратов опухолей желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), удаленных во время радикального оперативного пособия: рак прямой кишки — 1, рак желудка — 7, рак сигмовидной кишки — 1, кардиозофагеальный рак — 1 (гистологическая структура: недифференцированный рак — 2, низкодифференцированный рак — 4, умереннодифференцированный рак — 3, высокодифференцированный рак — 1, коллоидный рак — 1). Для ЭХЛ был использован аппарат ECU 300 фирмы SOER-

ING. Факторные признаки: сила тока (50, 75, 90 мА), время воздействия (20, 40 мин), расстояние между электродами (10, 15 мм). После проведения ЭХЛ визуально и гистологически оценивались три зоны: деструкции вокруг катода и анода, неизменной ткани между электродами. Во время проведения ЭХЛ измеряли выходное напряжение прибора с интервалом 10 мин и последующим расчетом электрического сопротивления ткани на участке между электродами.

**Результаты.** В процессе ЭХЛ с увеличением времени экспозиции отмечается увеличение диаметра суммарной зоны деструкции вокруг электродов (от 0 до 10–25 мм) и уменьшения диаметра зоны неизменной ткани (от 15 до 0–6 мм). Рост диаметра суммарной зоны деструкции сопровождается уменьшением сопротивления ткани на участке между электродами. Исходное сопротивление опухолевой ткани в зависимости от расстояния между электродами и гистологической структуры опухоли колеблется в пределах 74–393 Ом; во время ЭХЛ происходит снижение значений сопротивления до 32–386 Ом. Временная точка перекрещивания зон деструкции вокруг катода и анода сопровождается повышением электрического сопротивления на 4–134 Ом в течение 10 мин экспозиции от точки наименьшего значения сопротивления.

**Выводы.** 1. Динамика изменения электрического сопротивления ткани между электродами во время ЭХЛ может быть использована как показатель эффективности ЭХЛ злокачественных опухолей ЖКТ и/или метастатического поражения паренхиматозных органов. 2. Необходима проверка полученных данных в эксперименте на животных с оценкой отсроченных и отдаленных результатов.

*Е. Ю. Колдаева<sup>1</sup>, Е. Ю. Григорьева<sup>1</sup>, М. Г. Найденов<sup>1</sup>, Ю. В. Стукалов<sup>1</sup>, В. А. Ольшевская<sup>2</sup>, А. В. Зайцев<sup>2</sup>, Рами Аюб<sup>2</sup>*

**Биораспределение борированного гема — носителя бора при нейтронозахватной терапии (НЗТ)**

<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>2</sup> Институт элементоорганических соединений им. Несмеянова РАН, Москва

Условием успешного проведения нейтронозахватной терапии на  $^{10}\text{B}$  является преимущественное накопление носителя  $^{10}\text{B}$  бора в опухолевых клетках в достаточном количестве (приблизительно 5–14 мкг  $^{10}\text{B}$  на 1 г опухоли для нейтронного потока 2 кэВ в зависимости от отношения опухоль/кровь и локализации бора в клетке). Большое значение имеет также градиент концентраций  $^{10}\text{B}$  между опухолью и здоровыми тканями. Подразумевается, что этот градиент не должен быть больше 1. С этой точки зрения мы оценили предложенный к исследованию борсодержащий препарат, представляющий собой борированный гем (1), содержащий 43 % бора и имеющий биологические предпосылки для накопления в опухоли.

**Материал и методы.** Биораспределение (1) изучали на модели крысиной саркомы М1, подкожно привитой крысам-самцам линии Wistar в срок 3 и 24 ч после введения 16,8 мг  $^{10}\text{B}$  на 1 кг массы тела. Соединение (1) вводили внутривенно в 2 мл 20% ДМСО на физиологическом растворе. Через 3 и 24 ч животных декапитировали, предварительно забрав кровь из подключичной артерии. Для определения бора брали опухоль и прилежащие к ней ткани — кожу, мышцы. Дополнительно анализировали кровь и ткани органов выделения — печень, почки. Органы промывали в физиологическом растворе, осушали фильтровальной бумагой, взвешивали и замораживали при температуре  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ . Содержание бора определяли методом нейтронорадиационного анализа в тепловом пучке реактора «ИР-8» ФГУ РНЦ «Курчатовский институт». Количество бора выражали в мкг/г сырой ткани.

**Результаты и выводы.**  $^{10}\text{B}$  в значительных количествах накапливался в опухоли, а также в крови и во всех исследуемых органах уже через 3 ч после введения соединения (1). Через сутки содержание  $^{10}\text{B}$  несколько снижалось и лишь в почках оставалось постоянным. Полученные результаты подтвердили данные Fairchild, что порфирины накапливаются в паренхиматозных органах в большей степени, чем в опухоли. Тем не менее следует отметить, что уровень  $^{10}\text{B}$ , определяемый в опухоли, 19,6 и 13,1 мкг/г ткани через 3 и 24 ч соответственно отвечает необходимым условиям как количественно, так и по временному параметру для проведения облучения. Это делает (1) перспективным для дальнейшего изучения с целью адаптации его

к использованию при НЗТ. В частности, возможно введение борированного гема при облучении поверхностно расположенных опухолей.

*Е. Ю. Колдаева<sup>1</sup>, Е. Ю. Григорьева<sup>1</sup>, А. С. Масько<sup>1</sup>,  
В. А. Ольшевская<sup>2</sup>, А. В. Зайцев<sup>2</sup>, Рами Аюб<sup>2</sup>*

#### **Общая токсичность карборан-производных порфиринового ряда — препаратов для нейтронозахватной терапии (НЗТ)**

<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>2</sup> Институт элементоорганических соединений им. Несмеянова РАН, Москва

**Введение.** Использование НЗТ в онкологической клинике зависит в первую очередь от создания туморотропных <sup>10</sup>B-содержащих препаратов, обеспечивающих оптимальную концентрацию и микрораспределение <sup>10</sup>B в клетках злокачественных опухолей, оставаясь в них в течение необходимого для облучения времени. При этом соединение не должно быть токсично: ЛД<sub>50</sub> — не ниже 25 мг/кг массы животного, МПД — не ниже 10 мг/кг массы животного.

**Цель исследования.** Изучить токсикологические характеристики двух карборановых комплексов порфиринового ряда: борированного гема (1) и о-карборановой аминокислоты (2), содержащих 43 и 16 % <sup>10</sup>B соответственно.

**Материал и методы.** Исследование проводили на здоровых мышцах-самцах C<sub>57</sub>Bl/6 массой 20–22 г. Соединения вводили внутривенно в 0,2 мл ДМСО (1) и физиологического раствора (2). Испытывали дозы бора (мг) на 1 кг массы тела в интервале 15–175 мг/кг. Наблюдение за животными осуществляли в течение месяца. Павших мышей вскрывали, оценивали выраженные изменения кожных покровов и внутренних органов. Выживших животных взвешивали, оценивали общее состояние и поведение. Определяли значения максимальной переносимой дозы (МПД), абсолютно смертельной дозы (ЛД<sub>100</sub>) и по методу Кербера рассчитывали среднесмертельную дозу (ЛД<sub>50</sub>).

**Результаты и выводы.** Соединения (1) и (2) при введении в сублетальных дозах не вызывали видимых нарушений в состоянии и поведении животных. Были определены МПД, равные 100 и 31,2 мг бора на 1 кг массы тела для (1) и (2) соответственно. Введение летальных доз вызывало в течение первых 30 мин после введения заторможенное состояние, а в случае (1) и атаксию. Летальные дозы приводили к смерти в первые 2 ч после введения препаратов с развитием судорог в случае (1). При вскрытии не обнаруживали визуализированных изменений внутренних органов. У выживших животных не отмечали потери массы тела. На основании картины поведения и состояния мышей можно говорить о нейротоксичности соединений (1) и (2). Рассчитанные значения ЛД<sub>50</sub> составляли 137,5 мг бора на 1 кг массы тела для соединения (1) и 62,4 мг/кг для соединения (2).

Таким образом, оба соединения могут быть использованы для нейтронозахватной терапии опухолей с учетом существующей токсичности.

*Е. Ю. Контрощикова<sup>1</sup>, М. А. Крыжанова<sup>2</sup>,  
К. Н. Контрощикова<sup>1</sup>, В. В. Новиков<sup>2,3</sup>*

#### **Воздействие озонотерапии на сывороточное содержание растворимых дифференцировочных антигенов при онкогинекологических заболеваниях**

<sup>1</sup> Нижегородская государственная медицинская академия

<sup>2</sup> Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. И. Н. Блохиной

<sup>3</sup> Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского

**Цель исследования.** Исследовать сывороточный уровень растворимых антигенов CD38 (sCD38), CD50 (sICAM-3), CD95 (sFas) у больных онкогинекологическими заболеваниями при озонотерапии.

**Материал и методы.** В работе использовали образцы сыворотки крови 60 онкогинекологических больных (рак тела или шейки матки, рак яичников), которым в послеоперационном периоде наряду с общепринятым лечением проводили озонотерапию в виде внутривенного капельного введения озонированного физиологического раствора. В качестве группы сравнения использовали образцы сыворотки крови 40 больных, получавших стандартную терапию. Сывороточное содержание антигенов sCD38, sICAM-3, sFas определяли с помощью моноклональных антител серии ИКО разработанными

авторами иммуноферментными методами. Контролем служили образцы сыворотки крови здоровых женщин-волонтеров, сравнимых по возрасту с больными.

**Результаты.** Сывороточный уровень sFas-антигена у больных онкогинекологическими заболеваниями в предоперационном периоде был выше нормы в 3–4 раза и при проведении стандартной терапии имел тенденцию к снижению, но не достигал нормы к моменту выписки из стационара (11–12-е послеоперационные сутки). Включение в курс лечебных мероприятий озонотерапии приводило в эти же сроки к нормализации сывороточного уровня sFas-антигена. Сходным образом менялся сывороточный уровень растворимого антигена CD38. Повышенная в 2–3 раза его концентрация нормализовалась как при стандартном комплексе лечебных мероприятий, так и при его дополнении озонотерапией. Однако озонотерапия ускоряла этот процесс. Сывороточное содержание антигена sICAM-3 сохранялось у больных в пределах нормы как в предоперационный период, так и при выполнении всего спектра лечебных мероприятий.

**Выводы.** Озонотерапия приводит к ускоренной нормализации сывороточного содержания растворимых форм антигенов CD38 и Fas у больных онкогинекологическими заболеваниями. Представленные результаты согласуются с полученными ранее данными о положительном воздействии озонотерапии на клиническое течение послеоперационного периода.

*С. Н. Корякин, С. Е. Ульяненко, В. А. Ядровская,  
Я. В. Кривошеев*

#### **Влияние инфракрасного излучения на туморотропность меркаптододекабората натрия, меченного радиоактивным йодом**

*Медицинский радиологический научный центр РАМН, Обнинск*

**Цель исследования.** Изучить влияние инфракрасного излучения на распределение в опухоли и окружающих ее нормальных тканях меркаптододекабората натрия (<sup>131</sup>I-BSH) с целью повышения накопления препарата в опухоли и увеличения эффективности нейтронозахватной терапии (НЗТ).

**Материал и методы.** В работе были использованы мыши-самцы линии C<sub>57</sub>Bl/6 с имплантированной под кожу бедра меланомой B16. В качестве борсодержащего соединения использовали <sup>131</sup>I-BSH. Воздействие непрерывного потока инфракрасного (ИК) излучения на зону опухоли осуществляли с помощью светодиодной матрицы. Максимальная спектральная мощность излучения приходилась на длину волны 0,89 мкм при полуширине полосы 0,03 мкм. Интегральная по спектру мощность излучения составляла 4,10±0,15 мВт. Радиоактивность <sup>131</sup>I-BSH в опухоли и окружающих тканях (кровь, кожа, мышца) регистрировали в разные сроки после введения соединения с помощью колодезного сцинтилляционного счетчика.

**Результаты.** Изучено несколько режимов воздействия ИК-светом: до и после введения меченого соединения. При 10-минутном воздействии на зону опухоли ИК-излучения непосредственно перед введением <sup>131</sup>I-BSH отмечено небольшое увеличение содержания соединения в опухоли и окружающих тканях во всем диапазоне исследования. Существенного увеличения накопления <sup>131</sup>I-BSH в опухоли удалось достичь при воздействии ИК-излучения через 1 ч после введения соединения. Так, воздействие ИК-излучения на зону опухоли привело к повышению накопления <sup>131</sup>I-BSH в опухоли, крови и коже через 6 ч после введения более чем в 3 раза по сравнению с накоплением без воздействия ИК-излучения.

**Выводы.** Из двух изученных схем воздействия инфракрасного света значимое увеличение накопления соединения в опухоли удалось достичь при воздействии ИК-излучения на зону опухоли через 1 ч после введения соединения. Полученные данные дают основание отнести инфракрасное излучение к модификаторам туморотропных свойств меркаптододекабората натрия.

*Н. Ю. Кульбачевская, Л. М. Михайлова, Е. Л. Членова,  
О. И. Коняева, Н. П. Ермакова, Е. В. Обухов*

#### **Влияние ультразвука на токсическое и побочное действие терафтала**

*ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*

**Цель исследования.** Изучение влияния терапевтического ультразвука на токсическое и побочное действие терафтала у грызунов.

**Материал и методы.** Исследования проведены на 120 неинbredных крысах-самцах, массой 250–280 г. В экспериментах по острой токсичности терафтал (ТФ) вводили внутривенно однократно в интервале доз 20, 25, 30, 35 и 40 мг/кг. В экспериментах по субхронической токсичности ТФ применяли 3-кратно внутривенно ежедневно в разовой дозе 5 и 10 мг/кг (суммарная доза 15 и 30 мг/кг), соответствующих  $1/2$  МПД и МПД при многократном введении. Через 15–20 мин после введения препарата крысы подвергались воздействию ультразвука (УЗ) УСДТ-установки в терапевтическом фиксированном режиме под водой с двух полей: 1-е — 0,88 МГц мощностью 1 Вт/см<sup>2</sup>; 2-е — 2,7 МГц мощностью 2 Вт/см<sup>2</sup>. Время воздействия во всех исследованиях — 10 мин. Оценку влияния УЗ при совместном применении с ТФ на органы и ткани проводили после многократного воздействия.

**Результаты.** В исследованиях по острой токсичности установлено, что УЗ оказывает влияние на токсичность ТФ, ускоряя реализацию токсических эффектов препарата (гибель в первые минуты и часы) без изменения расчетных токсических доз и клинической картины интоксикации. При совместном многократном применении ТФ в суммарной дозе 30 мг/кг с УЗ токсические эффекты не выявлены. В то же время один ТФ в той же дозе при многократном внутривенном применении вызывает снижение количества эритроцитов и уровня гемоглобина в периферической крови крыс (в среднем на 20–30 %), увеличивает активность ферментов печени (АЛТ — в 3 раза, АСТ — в 2 раза), а также вызывает умеренное увеличение количества мочевины. ТФ при многократном внутривенном применении в суммарной дозе 15 мг/кг при совместном применении с УЗ и один ТФ не вызывают функциональных изменений в органах и тканях животных.

**Выводы.** Таким образом УЗ снижает риск возникновения функциональных повреждений органов и тканей животных при применении ТФ: предотвращает развитие гематологической токсичности, снижает гепато- и нефротоксичность.

*Исследование поддержано Правительством Москвы.*

*В. Г. Лихванцева, О. Ю. Мерзлякова*  
**Транспупиллярная терапия отграниченных гемангиом хориоидеи как альтернатива брахитерапии**

*ГУ НИИ глазных болезней РАМН, Москва*

**Введение.** Гемангиома хориоидеи (ГХ) — редкая внутриглазная опухоль. Ее доля среди всех внутриглазных новообразований едва достигает 0,76 %. Несмотря на молодой возраст пациентов (медиана 35,2 лет) и отсутствие угрозы для их жизни, фатальные исходы для зрительных функций и глаза как косметического органа в отсутствие лечения наблюдаются довольно часто. Биологические особенности поведения ГХ — юкстапапиллярная локализация с охватом более 50 % диска зрительного нерва, и/или присутствие высокой экссудативной отслойки сетчатки, и/или большая протяженность ее основания — порой не позволяют прибегнуть к традиционной брахитерапии, в связи с чем поиск новых методов лечения ГХ чрезвычайно актуален.

**Цель исследования.** Изучить возможности транспупиллярной термотерапии (ТТТ) в лечении ГХ.

**Материал и методы.** Наблюдали 5 пациентов с отграниченными гемангиомами хориоидеи (ГХ). Высота опухолей варьировала от 2,5 до 5,5 мм, площадь основания — от 3 до 20 мм. В 4 случаях ГХ располагалась юкстапапиллярно, охватывая более 50 % окружности диска зрительного нерва, что служило противопоказанием для применения брахитерапии. В 1 случае ГХ была в центральном отделе глазного дна, но диаметр ее основания составлял 20 мм, что также превышало возможности брахитерапии. На 1-м этапе всем пациентам проводили отграничительную лазеркоагуляцию сетчатки с целью профилактики отслойки после ТТТ. Последнюю проводили спустя 2 нед. после формирования прочного хориоретинального рубца вокруг опухоли на диодном лазере с длиной волны 810 нм производства IRIDEX (США). Мощность лазерного воздействия варьировала от 250 до 1150 мВт и зависела от высоты опухоли и близости к центральным отделам сетчатки и диску зрительного нерва. Экспозиция всегда составляла 60 с. Диаметр светового пятна в фокальной плоскости колебался от 600 до 3000 мкм, коли-

чество сеансов облучения — от 1 до 3. Срок наблюдения составил 15–19 мес.

**Результаты.** У всех 5 пациентов была достигнута полная регрессия опухоли с формированием плоского хориоретинального рубца. В 1 случае после ТТТ развилась высокая экссудативная отслойка сетчатки, которая прилегла самостоятельно в течение 1 мес.

**Выводы.** ТТТ может быть не только методом выбора и/или альтернативой в лечении отграниченных ГХ, но и применяться в тех случаях, где брахитерапия непригодна.

*В. И. Соловьев, А. В. Борсуков, С. Н. Щаева*  
**Возможности электрохимического лизиса в малоинвазивном лечении очаговых доброкачественных заболеваний молочной железы**  
*Областной онкологический клинический диспансер, Смоленск*  
*ПНИЛ «Ультразвуковые исследования и малоинвазивные технологии», Смоленск*

**Цель исследования.** Провести оценку клинической эффективности электрохимического лизиса (ЭХЛ) в лечении локализованных форм мастопатии.

**Задачи.** Оценить результаты ЭХЛ при воздействии на локализованное образование и здоровую ткань молочной железы вокруг очага в различных режимах лизиса, разработать алгоритм выбора индивидуального режима ЭХЛ.

**Материал и методы.** Проведены сеансы ЭХЛ доброкачественных очаговых заболеваний молочной железы на 50 послеоперационных препаратах, из них 36 — фиброаденомы и 14 — узловая форма фиброзно-кистозной мастопатии (ФКМ). Применялись моно- и биполярные электроды диаметром 1,5–2,5 мм на аппарате ECU-300 (фирмы Soring, Германия). Количество сеансов лизиса 1–8 на один курс, количество курсов 1–4.

**Результаты.** Проведена патоморфологическая оценка результатов. За 1 сеанс асептический некроз достигал 30 мм в диаметре, для опухолей большего размера применялось 4–6 монополярных электродов с их позиционированием во всех отделах очага. Полный ответ на лечение (46,5 %) после 1 курса (1–3 сеанса) наблюдался у доброкачественных опухолей (фиброаденом) диаметром 25–35 мм. По периферии очага у 98 % препаратов фиброаденом гистологически выявлены специфические поражения клеток электротокком в виде глубокой дистрофии. У опухолей диаметром 40–55 мм выявлен частичный ответ (34,5 %), большую часть составили узловые формы ФКМ. Предположительно в основу алгоритма выбора индивидуального режима ЭХЛ будут входить следующие характеристики: размер опухоли, морфологическая структура (соотношение эпителиального и соединительнотканного компонентов, степень выраженности фиброза).

**Выводы.** Установлен эффективный режим ЭХЛ для лечения фиброаденом молочной железы до 25 мм в диаметре: время воздействия 40 мин при силе тока 90 мА. Целесообразно включение методики ЭХЛ для лечения локализованных форм мастопатии в программу хирургической помощи больным с доброкачественными опухолями молочной железы.

*Е. В. Хорошева<sup>1</sup>, И. С. Голубева<sup>1</sup>, Г. К. Герасимова<sup>1</sup>, А. Л. Николаев<sup>2</sup>*

**Изучение цитотоксического эффекта комбинации ультразвукового воздействия с терафталом**

<sup>1</sup> *ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*

<sup>2</sup> *МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва*

**Введение.** Ранее было показано, что ультразвуковое (УЗ) воздействие на опухоли животных с 2 полями разной частоты (2,64 и 0,7 МГц) приводит к замедлению роста опухоли, а в сочетании с введением животным терафтала (ТФ) противоопухолевый эффект значительно возрастает (Н. В. Андропова, Е. М. Трещалина). При этом выявлено значительное повреждение не только опухолевой ткани, но и сосудистого русла опухоли.

Поскольку противоопухолевый эффект может быть следствием повреждения сосудов, питающих опухоль, представляло интерес оценить прямое цитотоксическое действие на опухолевые клетки *in vitro* комбинации ТФ+УЗ при УЗ-воздействии с 1 и 2 полями.

**Цель исследования.** Оценка прямого цитотоксического действия на опухолевые клетки разных режимов УЗ-воздействия и в сочетании с препаратом ТФ.

**Материал и методы.** ТФ (окта-4,5-карбокситаллоцианин кобальта II) синтезирован в ФГУП ГНЦ «НИОПИК». УЗ-воздействие на клетки проводили на ультразвуковой установке, специально разработанной для исследований *in vitro*. Суспензию клеток асцитного рака Эрлиха ( $10^6$  кл./мл) в среде RPMI-1640 с 10 % фетальной сыворотки помещали в 20 мл флаконы и инкубировали 2 ч при температуре 37 °С в присутствии ТФ ( $10^{-7}$ М,  $10^{-6}$ М,  $10^{-5}$ М) или без ТФ (контроль). Затем клетки отмывали от препарата и помещали в свежую питательную среду. УЗ-воздействие осуществляли в течение 3 мин через дно флакона, помещенного в воду (37 °С) как проводящую среду. Режимы УЗ-воздействия: режим 1 — с одного поля при частоте 2,64 или 0,7 МГц разной мощности; режим 2 — с двух полей с такими же характеристиками. Затем клетки инкубировали в CO<sub>2</sub> термостате при 37 °С в течение 48 ч, после чего оценивали их жизнеспособность с помощью МТТ-теста.

**Результаты.** Установлено, что УЗ-воздействие с одного поля частотой 2,64 МГц и мощностью 1,3 Вт/см<sup>2</sup> не влияет на жизнеспособность опухолевых клеток. При увеличении мощности в диапазоне 1,7–3,3 Вт/см<sup>2</sup> наблюдается гибель 80 % клеток. УЗ-воздействие с 1 поля при частоте 0,7 МГц и мощности в диапазоне 0,9–2,3 Вт/см<sup>2</sup> не изменяет жизнеспособность клеток. Воздействие на клетки УЗ с 2 полей (1-е поле — 2,64 МГц, 1,3 Вт/см<sup>2</sup>, 2-е поле — 0,7 МГц, 0,9–2,3 Вт/см<sup>2</sup>), каждое из которых не обладает прямым цитотоксическим действием, также не влияло на жизнеспособность клеток. Если клетки перед УЗ-воздействием инкубировали в течение 2 ч в среде с разными концентрациями ТФ, то число жизнеспособных клеток снижалось в прямой зависимости от концентрации ТФ: на 40 % при  $10^{-7}$ М ТФ, на 60 % при  $10^{-6}$ М и на 80 % при  $10^{-5}$ М. Без УЗ-воздействия ТФ в исследованном диапазоне концентраций не влиял на жизнеспособность клеток.

**Выводы.** Таким образом, ТФ является сильным соносенситизатором, значительно усиливающим прямое повреждающее действие УЗ на клетки.

*Работа выполнена в рамках НТП «Разработка и внедрение в медицинскую практику новых методов и средств диагностики и лечения злокачественных и других заболеваний».*

*Е. Л. Членова, Л. М. Михайлова, Н. Ю. Кульбачевская, И. Б. Меркулова, О. И. Коняева, Н. П. Ермакова, Т. В. Абрамова*

### **Влияние ультразвука на токсичность карбоплатина** *ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*

**Цель исследования.** Изучение влияния ультразвука УСДТ-установки, предназначенной для сонодинамической терапии онкологических больных, на токсичность противоопухолевого препарата карбоплатина.

**Материал и методы.** Исследования проведены на 160 неинбредных крысах-самцах массой 250–300 г. Карбоплатин (Pharmacia&Upjohn) применяли внутривенно однократно и многократно (3 раза) ежедневно в диапазоне доз 30–120 мг/кг. Суммарные дозы при многократном введении препарата соответствовали МПД и  $1/4$  МПД при однократном применении карбоплатина. Через 15–20 мин после введения препарата крысы подвергались воздействию ультразвука (УЗ) в терапевтическом фиксированном режиме под водой (в ванне) с двух полей: 1-е — 0,88 МГц мощностью 1 Вт/см<sup>2</sup>; 2-е — 2,7 МГц мощностью 2 Вт/см<sup>2</sup>. Температура воды 34,5–35,0 °С. Время воздействия во всех исследованиях 10 мин. После многократного воздействия проводили функциональную и гистологическую оценку влияния карбоплатина в комбинации с УЗ на органы и ткани животных.

**Результаты.** Установлено, что УЗ не изменяет переносимости животными карбоплатина, а именно: не увеличивает количество павших животных, не влияет на величину токсических доз карбоплатина, не изменяет сроков гибели и картину интоксикации у животных. УЗ-воздействие на животных, получавших многократно карбоплатин в МПД, не усиливает его гематологической токсичности (лейко- и тромбоцитопении) и функциональных изменений в почках (клетки крови и белок в моче). Однако УЗ усиливает у животных морфологические проявления нефро- и гепатотоксического действия карбоплатина. УЗ-воздействие на животных, получавших многократно карбоплатин в дозе  $1/4$  МПД, не оказывает влияния на морфофункциональные изменения в органах и тканях крыс, вызванных препаратом.

**Выводы.** УЗ не увеличивает токсичности карбоплатина по критериям острой токсичности. УЗ усиливает морфологические изменения в печени и почках, не влияя на изменения функционального состояния систем и органов животных, вызванные препаратом. Зафиксированные морфофункциональные изменения после применения карбоплатина и его комбинации с УЗ носят обратимый и дозозависимый характер.

*Исследование поддержано Правительством Москвы.*

## АРГЛАБИН

УДК 615.277.3.038«Арглабин»

*С. М. Адекенов*

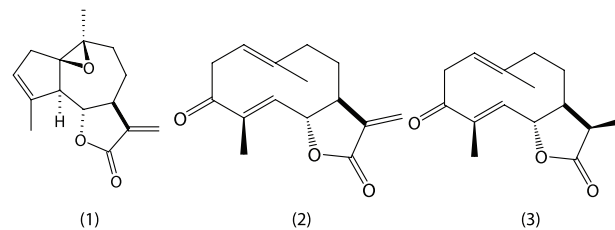
### **Оригинальный препарат арглабин. Перспективы фармакологических исследований и применение в клинике**

*Институт фитохимии МОН РК, Караганда, Казахстан*

Противоопухолевые препараты растительного происхождения находят широкое применение в комплексной химиотерапии при лечении гематобластозов и многих солидных опухолей, таких как рак легкого, молочной железы, саркома. Во флоре Казахстана насчитывается более 6 тыс. видов растений, из которых лишь 150 используются в медицине.

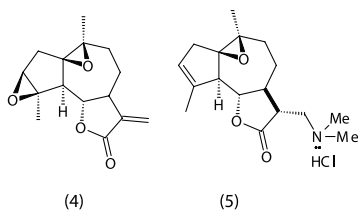
В Институте фитохимии проведено химическое исследование экстрактов 160 видов растений Казахстана с одновременным скринингом на биологическую активность. Перспективными для дальнейшего углубленного изучения оказались 52 вида, экстрактивные вещества которых проявили биологическую активность. Сравнительно выраженной противоопухолевой активностью среди них обладал экстракт наземной части эндемичного растения полыни гладкой (*Artemisia glabella* Kar. et Kir.) [12]. Химическое изучение полыни гладкой показало содержание в его цветочных корзинах, листьях и бутонах сесквитерпеновых лактонов (арглабин (1), арголид (2) и дигидроарголид (3)) [1; 19], флавоноидов (цирсилинол, кастицин,

лютеолин, бонанзин, триптофан, пектолинаригенин) [14], эфирного масла (1,8-цинеол, линалоол, терпинеол-4,  $\alpha$ -терпинеол) [7], аминокислот (глутамин, аргинин, глутаминовая кислота, пролин, тирозин, триптофан, лейцин), углеводов (глюкоза, рамноза, дульцит), фенолосоединений (галловая, кофейная, салициловая, коричная) [9].



По результатам биоскрининга ряда сесквитерпеновых лактонов установлены выраженные противоопухолевые свойства арглабина (1), что обусловило выбор его в качестве источника для разработки нового лекарственного препарата [2]. На следующем этапе для исследования зависимости структура — биологическая активность, так и для поиска новых биологически активных соединений нами получено 37 производных арглабина.

Скрининг арглабина и его производных показал, что сравнительно выраженной противоопухолевой активностью в отношении большинства перевиваемых штаммов обладают эпоксиарглабин (4) и гидрохлорид диметиламиноарглабина (5), для которых степень ингибирования роста перевиваемых опухолей составляет от 36 до 88 % [3].



Для дальнейших исследований нами выбран гидрохлорид диметиламиноарглабина (5), обладающий высокой противоопухолевой активностью и являющийся водорастворимым веществом. На его основе разработан оригинальный противоопухолевый препарат арглабин [4–6; 20].

Противоопухолевые, токсические и фармакологические свойства препарата арглабин в эксперименте исследованы в 1982–1991 гг. на базе Казахского научно-исследовательского института онкологии и радиологии МЗ РК г. Алматы [15; 21].

В период с 1994 по 1999 г. препарат арглабин прошел 3 фазы предрегистрационных клинических испытаний на базах клиник Казахского научно-исследовательского института онкологии и радиологии, Карагандинского областного онкологического центра, Актюбинского онкодиспансера.

I фаза клинических испытаний проведена у 53 больных с III–IV стадией злокачественного процесса по 2 локализациям путем внутривенного введения препарата; II фаза — у 72 больных с IV стадией опухолевого процесса различной локализации. При этом объективный положительный эффект получен у 44 % больных, субъективный — у 28 %. Сравнительно выраженный эффект препарат показал в случае первичного рака печени, молочной железы, легких и яичников. В процессе проведения I–II фазы испытаний выявлено, что препарат не вызывал токсических иммунодепрессивных реакций и не влиял на кровотворение.

В рамках III фазы клинических испытаний изучение противоопухолевой активности препарата проведено у 75 больных раком печени, легкого и молочной железы.

По итогам доклинических исследований и результатам 3 фаз клинических испытаний препарат арглабин зарегистрирован в Республике Казахстан в качестве противоопухолевого средства (регистрационное удостоверение РК-ЛС-5 № 003950 от 12.1999 г.). Решением Коллегии Агентства Республики Казахстан по делам здравоохранения № 10/1 от 22.12.2000 г. препарат арглабин включен в «Список основных жизненно важных лекарственных средств и средств дезинфекции Республики Казахстан». В 2005 г. арглабин прошел перерегистрацию в качестве противоопухолевого средства и Приказом Министерства здравоохранения РК повторно включен в «Список основных жизненно важных лекарственных средств Республики Казахстан».

За период с 2000 по 2006 г. проведен широкий комплекс экспериментальных и клинических исследований противоопухолевого препарата арглабин.

В РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН (Москва) проведено экспериментальное изучение радиосенсибилизирующего действия препарата арглабин при облучении перевивных опухолей мышей, а также при локальном облучении кожи, рассматриваемой как пример нормальной ткани. В экспериментах использовано три вида опухолей: карцинома легких Льюиса, солидная карцинома Эрлиха линии ELD и меланома B16. Установлено, что арглабин усиливает лучевое поражение опухолей, что приводит к значительному уменьшению оптимальной дозы облучения. В то же время под влиянием препарата не усиливаются лучевые реакции нормальных тканей, т. е. он может рассматриваться как средство, обладающее радиосенсибилизирующим действием на опухоли [8].

Эффективность применения арглабина в клинической практике также подтверждена в РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. Клинические испытания, проведенные на 20 больных местнораспространен-

ном раком молочной железы, показали, что арглабин обладает выраженным радиосенсибилизирующим действием, что приводит к увеличению частоты полных регрессий опухоли до 20 % в сравнении с 5 % в контроле. При этом достоверно повышается вероятность лучевого патоморфоза в опухоли III–IV степени [10].

В Научно-исследовательском институте эпидемиологии и микробиологии (НИИЭМ) им. Н. Ф. Гамалеи РАМН (Москва) исследовано влияние препарата арглабин (гидрохлорида диметиламиноарглабина (5)) и арглабина нативного (1) на интерфероновый и цитокиновый статус *in vitro*. Выявлено, что у относительно здоровых добровольцев применение арглабина в дозе 4 мкг/мл может вызывать индукцию генов цитокинов, вырабатываемых Th1- и Th2-лимфоцитами, т. е., по-видимому, препарат может быть использован для профилактики ряда заболеваний. Кроме того, выявлено, что использование арглабина и арглабина нативного (4 мкг/мл) у больных ревматоидным артритом может приводить к активации генов цитокинов, вырабатываемых Th1- и Th2-лимфоцитами, а также фактора противоопухолевой защиты NF-κappaB и супрессорного цитокина TGF-β. Данные, полученные в условиях *in vitro*, подтвердились и при проведении клинических испытаний арглабина в режиме монотерапии у 18 больных местнораспространенным раком молочной железы. Установлено, что препарат обладает определенным цитотоксическим действием, сопоставимым с воздействием стандартной полихимиотерапии в режиме CMF, что подтверждается лекарственным патоморфозом опухоли. При этом доказано, что арглабин восстанавливает механизм синтеза следующих цитокинов: ИФН-γ, ИЛ-2, противовоспалительного цитокина ИЛ-4, ФНО-α, обладающего избирательной цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток, а также ИЛ-1β, способного опосредовать развитие системного острофазного ответа и в значительной степени сходного с ФНО-α по функциональной активности. Полученные данные свидетельствуют о высокой иммунокорректирующей способности арглабина у больных местнораспространенным раком молочной железы [11].

При использовании препарата арглабин в комбинации с химиотерапией у 34 инкурабельных и ослабленных больных (индекс Карновского 60–70 %) при выраженном прогрессировании процесса и устойчивости к стандартной химиотерапии профессором Альбертом Шеллером (Leonardis Klinik, г. Бад-Хайльбрун, Германия) был достигнут положительный эффект в 44 % случаев. Полученные результаты свидетельствуют о химиосенсибилизирующей способности арглабина. Арглабин является препаратом выбора у ослабленных и инкурабельных больных, когда другие виды стандартной противоопухолевой терапии неприемлемы [18].

При сочетании лучевой терапии с арглабином у больных местнораспространенным раком молочной железы отмечается позитивный эффект арглабина, проявляющийся как в ограничении интенсификации ПОЛ, так и в снижении степени эндотоксемии. Таким образом, полученные данные показали, что в крови больных местнораспространенным раком молочной железы наблюдается синхронное усиление окислительной модификации белков и активации перекисного окисления липидов. Данные изменения сохраняются или нарастают на фоне лучевой терапии, тогда как арглабин ограничивает интенсивность окислительного стресса в крови больных [16].

На 40 больных с хроническими гемобластозами изучена возможность применения арглабина в режиме монотерапии и в сочетании с химиотерапией. Установлено, что арглабин оказывает положительный эффект при лечении хронических лимфопролиферативных заболеваний, более выраженный при комбинации с цитостатиками. Применение арглабина сопровождается положительными сдвигами показателей иммунного статуса, коагулограммы, улучшением качества жизни больных [17].

В 2004 г. арглабин зарегистрирован в качестве противоопухолевого средства в Кыргызской Республике и Республике Таджикистан, а в 2006 г. — в Российской Федерации и Грузии. Проведена первичная экспертиза препарата в Государственном фармакологическом центре Министерства здравоохранения Украины, материалы переданы для проведения специализированной оценки.

В марте 2005 г. в рамках IV Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты» на базе ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина состоялся сателлитный симпозиум «Экспериментальные и клинические аспекты применения про-



тивоопухолевого препарата арглабин». Решением симпозиума стало признание создания нового оригинального противоопухолевого препарата арглабин и рекомендация его широкого применения в Российской Федерации после регистрации в установленном порядке, а также проведение широкомасштабных многоцентровых клинических исследований препарата в лечении рака предстательной железы, мочевого пузыря, яичников, шейки и тела матки, легкого и пищевода при сочетании с химио- и лучевой терапией.

Во исполнение решения вышеуказанного симпозиума на базе Карагандинского областного онкологического центра проводятся клинические испытания препарата арглабин в качестве радиомодификатора у больных раком пищевода и шейки матки в комбинации с лучевой терапией динамическим фракционированием дозы. Исследуются непосредственный клинический эффект, особенности динамики регрессии объема опухоли и результаты лечения в динамике.

На базе Национального центра онкологии МЗ Кыргызской Республики (Бишкек) проводятся клинические испытания препарата арглабин у больных раком шейки матки.

На базе Центра молекулярно-генетической диагностики А. Х. Сабинова (Тюмень) запланированы испытания арглабина при лечении рака печени и у больных с мутациями гена K-ras. Известно, что при патологических изменениях печени значительное количество нарушений имеют гены группы ras, в большей степени это касается гена K-ras, имеющего высокую степень встречаемости внутри этой группы. Нарушения онкогена K-ras встречаются примерно в 1/3 случаев при солидных опухолях. Так, при опухолях толстой кишки и аденокарциноме поджелудочной железы более 90 % мутаций приходится на ген K-ras. В большинстве опухолей с дефектным онкогеном K-ras выявляются точечные мутации в 12-м кодоне. Мутации гена K-ras обычно происходят на более ранних стадиях онкогенеза, чем мутации в гене p53, что в сочетании с высокой чувствительностью метода, основанного на ПЦР, создает возможность доклинической диагностики заболевания, что, несомненно, положительно скажется на эффективности лечения. Представляет значительный интерес оценка эффективности использования арглабина при лечении рака печени в сравнении со стандартными методиками лечения, а также определение, является ли данный препарат таргетным для данной патологии.

Перспективным направлением в плане применения арглабина в клинической практике считается проведение рандомизированных клинических испытаний при раке молочной железы по международным стандартам с привлечением мониторов, обладающих сертификатом FDA.

Кроме того, в Институте фитохимии проводятся работы как по выявлению других видов биологической активности арглабина, так и по получению его новых производных с целью поиска соединений, обладающих более выраженными противоопухолевыми свойствами. Так, изучено противовирусное действие арглабина в отношении вируса иммунодефицита человека и вируса гриппа А. Установлено, что арглабин препятствует заражению вирусом иммунодефицита клеток перевиваемой линии лимфоцитов человека. При этом выраженный эффект чаще наблюдался при предварительном внесении арглабина, чем при одновременном внесении лактона и вируса. На культуре фибробластов легких эмбриона человека доказано, что арглабин проявляет 100%-й ингибирующий эффект в отношении вируса гриппа А. В параллельных исследованиях доказано снижение репродукции вируса геморрагической лихорадки и вируса полиомиелита ядер на 90–98 % при совместной инкубации указанных вирусов с арглабином на перевиваемых культурах клеток [13].

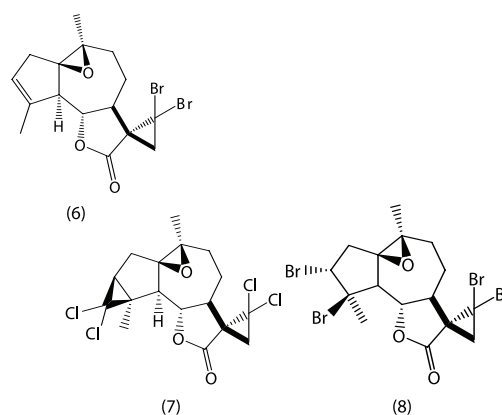
В связи с тем что для многих сесквитерпеновых лактонов характерно наличие выраженных антибактериальных и противогрибковых свойств [22], нами изучалось аналогичное действие арглабина и его производных. Антибактериальное действие изучали для арглабина и его 6 производных. Установлено, что сравнительно высокой антибактериальной активностью среди изученных производных обладает дибромкарбенпроизводное арглабина (6), оказывая сопоставимое с препаратами сравнения действие. Остальные производные показали слабую и умеренно выраженную антибактериальную активность.

Противогрибковая активность арглабина превосходит эффект препарата сравнения нистатина, а его изученные производные обладают менее выраженными противогрибковыми свойствами.

При изучении фармакологических свойств арглабина на модели экспериментального хронического эндометрита установлены его выраженные противовоспалительные и иммуномодулирующие свойства. По влиянию на органы иммунной системы арглабин оказывает сопоставимое с тималином действие, а по некоторым показателям превосходит его.

Экспериментальные данные подтвердились и в условиях клиники. При изучении иммунологической эффективности арглабина в терапии рака молочной железы установлено его выраженное иммунокорректирующее действие.

В результате присоединения атомов хлора по обоим двойным связям в молекуле арглабина приводит к получению бисдихлорметиленового производного (7), обладающего выраженной противоопухолевой активностью.



В ходе скрининга установлено, что новое производное (7) значительно превосходит по цитотоксической активности исходный лактон (1). Следовательно, бисдихлорметиленовое производное арглабина может рассматриваться как перспективное соединение для дальнейших углубленных исследований и, в конечном итоге, для разработки нового высокоэффективного противоопухолевого препарата. Помимо выраженных цитотоксических свойств, указанное производное арглабина обладает выраженными фагоцитозстимулирующими и противотрихомонадными свойствами.

Также у (7) проявляются умеренные противотрихомонадные и противогрибковые свойства. При присоединении атомов брома вместо атомов хлора получено производное (8), обладающее выраженной противогрибковой активностью.

В целом в результате химической модификации сесквитерпенового лактона арглабина получен ряд производных, обладающих различными видами биологической активности: антибактериальной, противогрибковой, противовоспалительной, анальгетической, противопаразитарной и др.

Результаты исследований, связанных с влиянием различных функциональных групп в молекуле арглабина и его производных на их биологическую активность, представлены на рис. 1.

Реакции по эпоксидному циклу (раскрытие или его инверсия) приводят к значительному снижению противоопухолевой активности. Эпоксидирование по олефиновой двойной связи вызывает значительное повышение противоопухолевой активности. Гидроксилирование по двойной связи  $\alpha$ -метилен- $\gamma$ -лактонного цикла приводит к снижению биоактивности. Интерес представляют аминокислотные производные арглабина. Так, введение аминокислотной группы по двойной связи лактонного цикла приводит к получению водорастворимых производных. В ряду данных производных получены сравнительно эффективные соединения с противоопухолевой активностью. Одновременно аминокислотные производные обладают выраженной иммуномодулирующей, умеренной противовоспалительной, противогрибковой и антибактериальной активностью. Введение диалкилфосфонатной группы вызывает снижение противовоспалительных и слабых антибактериальных свойств. Особый интерес представляют производные, полученные в ходе реакций одновременно по нескольким функциональным группам, как, например, (7) и (8).

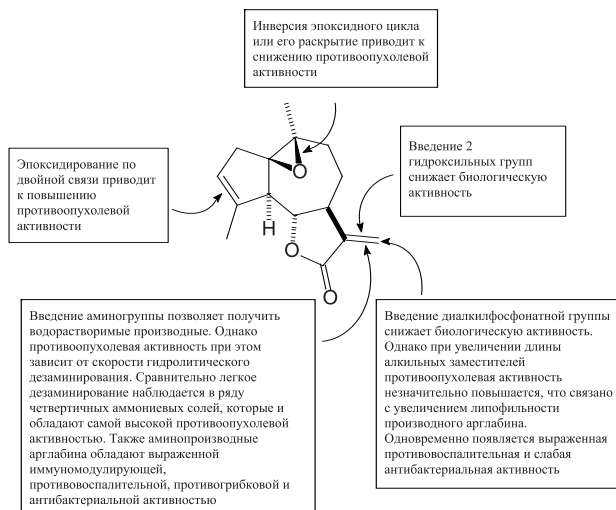


Рис. 1. Влияние различных функциональных групп в молекуле арглабина на его биологическую активность

Таким образом, сесквитерпеновый лактон арглабин (1), выделенный из надземной части полыни гладкой (*Artemisia glabella* Kar. et Kir.), является не только источником для получения одноименного противоопухолевого препарата, но и перспективен для создания на основе его производных оригинальных лекарственных препаратов, обладающих широким спектром терапевтической активности.

#### Литература

1. Адеkenов С. М., Мухаметжанов М. М., Куприянов А. Н., Казарлицкий А. Д. Арглабин — новый сесквитерпеновый лактон из *Artemisia glabella* Kar. et Kir. // Химия природных соединений. — 1982. — № 5. — С. 655.
2. Адеkenов С. М., Рахимов К. Д., Айтуганов К. А., Казарлицкий А. Д. О противоопухолевой активности сесквитерпеновых лактонов // Сборник работ по химии. — Алма-Ата, 1988. — Вып. 11. — С. 112–115.
3. Адеkenов С. М., Рахимов К. Д., Айтуганов К. А., Верменичев С. М. Противоопухолевые соединения на основе арглабина // Сборник работ по химии. — Алма-Ата, 1990. — Вып. 12. — С. 78–83.
4. Адеkenов С. М. Способ получения гидрохлорида 1 $\beta$ , 10 $\beta$ -эпоксидо-13-диметиламино-гвай-3(4)-ен-6,12-олида лиофилизированного — противоопухолевого средства арглабин лиофилизированный и устройство для его осуществления. Европейский патент Patent WO 98/28303 от 02.07.98 г. (PCT/KZ 97/00006).
5. Адеkenов С. М. Способ получения гидрохлорида 1 $\beta$ , 10 $\beta$ -эпоксидо-13-диметиламино-гвай-3(4)-ен-6,12-олида лиофилизированного — противоопухолевого средства арглабин лиофилизированный и устройство для его осуществления. Патент КНР № 97549 от 12.11.02 г.
6. Адеkenов С. М. Способ получения гидрохлорида 1 $\beta$ , 10 $\beta$ -эпоксидо-13-диметиламино-гвай-3(4)-ен-6,12-олида лиофилизированного, противоопухолевого средства арглабин из растительного сырья, устройство для экстрагирования растительного сырья. Патент РК №10913 от 07.01.04 г.
7. Атажанова Г. А., Дембицкий А. Д., Жижин Н. И., Адеkenов С. М. Химический состав эфирного масла полыни гладкой — *Artemisia glabella* Kar. et Kir. // Химия природных соединений. — 1999. — № 2. — С. 193–196.
8. Вайнсон А. А., Мещерикова В. В., Касаткина Н. Н. Изучение радиомодифицирующего действия препарата арглабин при локальном облучении перевивных опухолей и нормальной ткани (кожи) мышей // Рос. биотер. журн. — 2005. — Т. 4, № 2. — С. 32–34.
9. Итжанова Х. И. Фармакогностическое изучение полыни гладкой и разработка лекарственной формы арглабина: Автореф. дис... канд. фарм. наук. — Томск, 2003. — 27 с.
10. Манзюк Л. В., Ткачев С. И., Иванов С. М. и др. Предоперационная химиолучевая терапия местнораспространенного рака молочной железы с использованием арглабина в качестве радиосенсибилизатора // Рос. биотер. журн. — 2005. — Т. 4, № 2. — С. 68–71.

11. Мезенцева М. В., Щербенко В. Э., Еришов Ф. И. и др. Иммунологическая эффективность арглабина в терапии рака молочной железы // Рос. биотер. журн. — 2005. — Т. 4, № 2. — С. 64–67.
12. Мухаметжанов М. М., Адеkenов С. М., Турмухамбетов А. Ж. и др. О противоопухолевой активности экстрактивных веществ из растений семейства сложноцветных. В кн.: Проблемы рационального использования лекарственно-технических растений Казахстана. — Алма-Ата: Наука, 1986. — С. 230–232.
13. Невинский Г. А. Антивирусные свойства арглабина. В кн.: Клинические аспекты применения противоопухолевого препарата арглабин. — Караганда, 2002. — С. 213.
14. Прибыткова Л. Н., Адеkenов С. М. Флавоноиды растений рода *Artemisia*. — Алматы: Ғылым, 1999. — 180 с.
15. Рахимов К. Д. Фармакологическое и доклиническое изучение нового противоопухолевого препарата арглабин // Рос. биотер. журн. — 2005. — Т. 4, № 2. — С. 15–17.
16. Сирота В. Б., Муравлева Л. Е. ПОЛ-АОЗ и ОМБ крови больных раком молочной железы при комбинированной терапии с арглабином // Рос. биотер. журн. — 2005. — Т. 4, № 2. — С. 80–84.
17. Тургунова Л. Г., Досмагамбетова Р. С., Умбеталина Н. С. Применение арглабина в терапии гемобластозов // Рос. биотер. журн. — 2005. — Т. 4, № 2. — С. 96–99.
18. Шеллер А. Арглабин в лечении диссеминированных опухолевых процессов // Рос. биотер. журн. — 2005. — Т. 4, № 2. — С. 62–63.
19. Адеkenов С. М., Рахимова В. В., Дзахин К. А. et al. Sesquiterpene lactones from *Artemisia glabella* // Fitoterapia. — 1995. — Vol. LXVI, No. 2. — P. 142–146.
20. Адеkenov S. M. Method and device for production of lyophilized hydrochloride-1 $\beta$ ,10 $\beta$ -epoxy-13-dimethylamino-guaia-3(4)-en-6,12-olide. Patent USA 6,242, 617,B1, Jun.5.2001.
21. Arglabin. Its structure, properties and usage. — Virginia, USA: Virginia Beach 1997. — 38 p.
22. Picman A. K. Biological Activities of Sesquiterpene Lactones // Biol. System. Ecol. — 1986. — Vol. 14, No. 3. — P. 225–281.

Поступила 10.02.2006.

#### А. Ж. Абылдаева, С. Б. Ахметова, С. М. Адеkenов Кинетические параметры арглабина в составе стандартных и кислотоустойчивых капсул Институт фитохимии МОН РК, Караганда, Казахстан

**Цель исследования.** Изучить динамику концентрации арглабина в сыворотке крови после введения в составе стандартной и кислотоустойчивой капсул.

**Материал и методы.** В условиях *in vivo* определяли устойчивость сесквитерпенового лактона арглабина (АН) в зависимости от типа лекарственной формы: стандартные капсулы и кислотоустойчивые капсулы. Нами проведен сравнительный анализ концентрации АН в сыворотке крови. В эксперименте использовали 6 беспородных собак массой 10–15 кг. 3 особям с пищей вводили арглабин в обычной капсуле, 3 собакам — в кислотоустойчивой капсуле. В обоих случаях использовали капсулы с содержанием действующего вещества из расчета 10 мг/кг индивидуально для каждой собаки. Через 1 ч животных фиксировали и из бедренной вены брали кровь в объеме 5 мл. Сыворотку отделяли центрифугированием при 3000 об./мин в течение 15 мин. Экстракцию арглабина из сыворотки крови проводили по следующей методике: сыворотку обрабатывали холодным этанолом в соотношении 1:5 (сыворотка/этанол) для осаждения белков, тщательно перемешивали в течение 15 мин, центрифугировали 15 мин при 3000 об./мин, забирали органическую фракцию, обрабатывали хлороформом в соотношении 1:1, тщательно перемешивали в течение 15 мин, центрифугировали в тех же условиях. Отбирали хлороформно-спиртовую фракцию, фильтровали ее и проводили анализ на газожидкостном хроматографе.

**Результаты.** Концентрация АН, введенного в состав в кислотоустойчивой капсулы в сыворотке крови животных через 1 ч после введения, в 3 раза ( $3,05 \pm 0,15$  мкг/мл) превосходила концентрацию АН в стандартной капсуле ( $1,06 \pm 0,12$  мкг/мл). Через 2 ч концентрация АН в кислотоустойчивых капсулах в крови составила  $1,28 \pm 0,1$  мкг/мл, тогда как в стандартных капсулах —  $0,48 \pm 0,12$  мкг/мл, т. е. в 2,68 раза превосходила концентрацию последнего. Спустя 3 ч после введения АН не был обнаружен в сыворотке крови при обоих вариантах введе-

ния. По-видимому, имеет место перераспределение АН из центральной камеры в периферическую. Через 6 ч концентрация АН в кислотоустойчивых капсулах в сыворотке крови животных составила  $2,1364 \pm 0,10$  мкг/мл, тогда как АН в составе стандартных капсул в сыворотке крови не был обнаружен.

**Выводы.** Для дальнейших доклинических и клинических испытаний необходимо использовать кислотоустойчивые пероральные лекарственные формы арглабина.

*Л. Б. Айтисиева, Г. А. Омарова*

### **Изменение показателей резистентности облученного организма на фоне профилактического введения арглабина в эксперименте**

*Карагандинская государственная медицинская академия МЗ РК, Казахстан*

**Цель исследования.** Изучение влияния арглабина на различные компоненты нейрогуморальной регуляции при остром лучевом поражении, в частности на уровень эндогенных радиопротекторов (серотонина и гистамина).

**Материал и методы.** В эксперименте использовались беспородные половозрелые крысы-самцы массой 180–200 г. Модель радиационного поражения воспроизводили путем острого тотального однократного облучения животных на гамма-установке «Рокус» мощностью 1,5 Гр/мин в дозе 8 Гр. Проведены следующие серии эксперимента: 1-я — группа интактных животных; 2-я — группа сравнения по облучению (с моделью радиационного поражения); 3-я — группа с профилактическим введением препарата арглабин (препарат вводили внутривенно за 3 дня до облучения в дозе 10 мг/кг). Забой животных осуществляли методом декапитации в первую половину дня через 1, 3, 7, 14, 21 и 30 сут после облучения. Цельную кровь собирали в пробирки. Определение серотонина и гистамина проводили флюорометрическим путем в одной пробе (Л. Я. Прошина, 1982).

**Результаты.** Установлено, что при остром тотальном гамма-облучении животных группы сравнения уровень серотонина достоверно снижался на протяжении всего периода наблюдения (до 10 сут после облучения в связи со 100%-й гибелью животных) с подъемом на 3-и сутки. Уровень гистамина в группе сравнения имел тенденцию к снижению на протяжении периода наблюдения по сравнению с интактными. В группе с профилактическим введением препарата арглабин мы наблюдали непрерывный рост уровня серотонина в сыворотке крови с максимальным повышением нейромедиатора на 14-е сутки на 158 % по сравнению с интактными животными. Уровень гистамина в сыворотке крови достоверно повышался в 4 раза по сравнению с интактными с 1-х до 14-х суток (с незначительным снижением на 7-е сутки после облучения) и оставался в этих пределах до конца наблюдения (30-е сутки).

**Выводы.** Уровень серотонина в сыворотке крови животных в группе с профилактическим введением арглабина имеет картину волнообразного повышения вплоть до 14-х суток после облучения, что значительно выше показателя уровня серотонина в группе сравнения по облучению, с последующей тенденцией к снижению, оставаясь выше уровня интактных животных к концу наблюдения (30-е сутки). Гистамин в группе сравнения по облучению имел тенденцию к снижению, при коррекции арглабином в сыворотке крови животных повышение сохранялось на протяжении всего срока наблюдения.

### **Радиомодификация арглабином и кселодой при нестандартном фракционировании при раке молочной железы**

*Карагандинская государственная медицинская академия МЗ РК, Казахстан  
КГКП «Карагандинский областной онкологический центр»,  
Казахстан*

**Цель исследования.** Оценка эффективности применения арглабина и кселоды при нестандартном режиме лучевой терапии (ЛТ) у больных раком молочной железы (РМЖ).

**Материал и методы.** В настоящее исследование включена 101 больная РМЖ. Средний возраст пациенток составил 50,2 года, со II стадией — 61 больная, с III стадией — 40. Лечение больных РМЖ

проводилось методом слепой рандомизации. Выделено три группы больных. 1-я группа — 50 больных РМЖ, получавших предоперационную дистанционную гамма-терапию средним фракционированием с дневным дроблением дозы (ДГТ СФ ДДД), ежедневно 4 Гр, РОД 2 Гр 2 раза в сутки с интервалом между фракциями 4,5 ч на каждый объем. СОД 28–32 Гр. Операцию выполняли через 1–2 сут после окончания ЛТ всем больным в объеме радикальной мастэктомии по Маддену. 2-я группа — 26 больных РМЖ, в комплексное лечение которых включен курс неoadъювантной монотерапии арглабином при ДГТ СФ ДДД. Арглабин вводили по 185 мг/м<sup>2</sup> в виде 2% раствора внутривенно за 15–20 мин до сеанса ЛТ. Количество введенный преапарата — 8, суммарная доза варьировала от 1920 до 3520 мг. 3-я группа — 25 больных РМЖ, в комплексное лечение которых включен курс неoadъювантной монотерапии кселодой при ДГТ СФ ДДД. Кселода применялась перорально по 2 г 2 раза в сутки ежедневно перед облучением в течение 8 дней.

**Результаты.** При сравнении клинического эффекта ЛТ СФ ДДД с арглабином и с кселодой не получено достоверной разницы между этими группами. Положительный клинический эффект наблюдался у  $34,0 \pm 6,7$  % пациенток в группе, получавших только ЛТ СФ ДДД, у  $46,5 \pm 9,8$  % больных, получавших ЛТ с арглабином, у  $44,0 \pm 9,9$  % пациенток, получавших ЛТ с кселодой. В 1-й группе больных объем опухоли уменьшился в 1,2 раза, во 2-й — в 1,9 раза, в 3-й — в 1,8 раза. I и II степень патоморфоза оказались одинаковыми у пациенток всех групп. III степень патоморфоза отмечалась в 2,3 раза чаще у больных, получавших ЛТ СФ ДДД с арглабином, и в 1,3 раза чаще у пациенток с кселодой по сравнению с группой больных без радиомодификации.

**Выводы.** При предоперационной ЛТ СФ ДДД у больных РМЖ более выраженный радиомодифицирующий эффект выявлен при использовании арглабина, который проявился в повышении положительного клинического эффекта на 12,5 %, большим регрессе самой опухоли и учащении постлучевого патоморфоза опухоли III степени в 2,3 раза.

*П. К. Казымбет, Д. Д. Абдирасилова*

### **Оценка эффективности арглабина при комбинированном радиационно-термическом поражении в микроядерном тесте**

*Казахская государственная медицинская академия МЗ РК, Астана*

**Цель исследования.** Оценить цитогенетическую эффективность арглабина в микроядерном тесте при воздействии комбинированного радиационно-термического поражения на организм животных

**Материал и методы.** Опыты проводились на 33 белых беспородных крысах обоего пола массой 170–190 г, разделенных на 3 группы. 1-я группа — интактные крысы, контрольные, 2-я группа — крысы с комбинированным воздействием термического ожога и гамма-облучения, 3-я группа — крысы с комбинированным воздействием термического ожога и облучения, которым вводился арглабин в течение 3 дней перед воздействием в дозе 5 мг/кг внутривенно. Облучение проводили на базе онкологического диспансера г. Астана. Крыс помещали в специальные коробки из органического стекла и облучали на гамма-установке «Агат-С» в дозе 7 Гр при мощности дозы 714 мГр/мин однократно.

Комбинированное радиационно-термическое воздействие проводили последовательным сочетанием облучения и термического ожога. Костный мозг для микроядерного теста отбирали на 7-е и 14-е сутки после воздействия термического ожога и облучения и их сочетания. Умерщвление животных производили эфирной передозировкой. Приготовление препаратов для микроядерного теста проводили стандартным методом. Окрашивали микропрепараты красителем Гимзы, микроскопировали под световым микроскопом с объективом  $\times 100$ . Идентификацию микроядер (МЯ) проводили в неповрежденных полихроматофильных эритроцитах (ПХЭ), имеющих вид центрально расположенных, правильной округлой формы телец с окраской, подобной ядрам клеток. Подсчет частоты МЯ проводили в 1000 ПХЭ. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

**Результаты.** Изменение цитогенетической активности комбинированного воздействия термического ожога и облучения показало, что на 7-е сутки частота МЯ возросла до 3,04 % ( $p < 0,001$ ), на 14-е

сутки, несмотря на снижение на 35,1 %, частота МЯ остается более высокой. Комбинированное радиационно-термическое воздействие, по нашим данным, повышает уровень хромосомных повреждений в костномозговых клеточных элементах.

Было установлено, что наиболее всего цитогенетические повреждения клеток проявляются во время прохождения первых клеточных элементов, приводящих к задержке митозов, хромосомным повреждением и гибели клеток. Так, известно, что пик снижения митотического индекса и повышения клеток с хромосомными аберрациями приходится на 1-е сутки после облучения, что предположительно можно связать с прямым генотоксическим действием радиации. Комбинированное радиационно-термическое воздействие, по нашим данным, обладает большей цитогенетической активностью, о чем свидетельствует более высокая частота МЯ в костномозговых клеточных элементах. Нами установлено 7-кратное увеличение частоты МЯ по сравнению с контролем. В то же время модификация мутагенного эффекта спонтанного воздействия термического ожога и облучения не является аддитивной в сравнении с отдельными воздействиями.

Полученное нами устойчивое снижение показателей соотношения молодых и зрелых форм эритроцитов может быть результатом задержки митозов эритробластов, последней стадии делящихся клеток эритроцитарного ростка, которые и являются предшественниками ПХЭ и НХЭ, или повышенная гибель от цитотоксического эффекта.

Как свидетельствуют полученные нами данные, применение препарата арглабина в дозе 5 мг/кг ежедневно однократно за 3 дня перед облучением дает благоприятный эффект. На это указывают более низкие значения частоты МЯ в ПХЭ костного мозга на 7-е и 14-е сутки после комбинированного воздействия факторов. Так, на 7-е сутки частота МЯ составляет 1,25 % ( $p < 0,05$ ), на 14-е сутки — 1,18 % ( $p < 0,05$ ), что существенно отличается от данных без применения препарата. Под влиянием арглабина нормализуется соотношение молодых и зрелых форм эритроцитов после воздействия исследованных факторов.

**Выводы.** Применение иммуномодулятора арглабина перед комбинированным радиационно-термическим поражением значительно ослабляет цитогенетический эффект действующих агентов, ускоряет процессы восстановления гемопоэза.

*Р. С. Кузденбаева<sup>1</sup>, Н. В. Козаченко<sup>3</sup>, А. Е. Гуляев<sup>2</sup>,  
Е. А. Омаров<sup>2</sup>*

#### **Возможность изменения клеточной проницаемости для антибиотиков с помощью арглабина**

<sup>1</sup> *Национальный центр экспертизы лекарственных средств МЗ РК, Алматы, Казахстан*

<sup>2</sup> *Информационный лекарственный центр проекта «ЗдравПлюс», USAID, Караганда, Казахстан*

<sup>3</sup> *Карагандинская государственная медицинская академия МЗ РК, Казахстан*

Известно, что, несмотря на беспрецедентные успехи в терапии ВИЧ-инфекции, СПИД является главной мировой проблемой здравоохранения, оставаясь 1-й причиной смерти в Африке и 4-й ведущей причиной смерти во всем мире вследствие осложнений, связанных с внутриклеточным инфицированием (A. Pani et al., 2002). Лечение инфекций с внутриклеточной локализацией возбудителей — одна из самых трудных проблем современной антибиотикотерапии (P. S. Niemstra, 2001). Антибиотики при лечении СПИД-ассоциированных инфекций имеют гораздо меньший эффект, чем можно было бы ожидать (L. O. Eckert et al., 2003; C. A. Venson et al., 2003). Есть основания предполагать, что сниженный эффект антибиотиков в этой ситуации может быть связан с пониженной проницаемостью мембран лейкоцитов (С. И. Ревенко и др., 2005). Предпринимаются попытки поиска модификаторов проницаемости мембран. В качестве такового апробируется сесквитерпеновый лактон арглабин. В условиях *in vitro* проведено изучение количественных показателей связывания ряда антибиотиков (рифампицин, доксициклин, эритромицин, азитромицин, цефтриаксон) полиморфно-ядерными лейкоцитами и лимфоцитами, полученными у ВИЧ-инфицированных (23 человека). Определено, что связывание антибиотиков у ВИЧ-инфицированных отличается от связывания их у здоровых людей, количественные показатели проникновения антибиотиков в лейкоциты снижены на 50–75 %. Добавление в среду инкубации субстанции ар-

глабина (10 мкг/мл) в определенной степени влияет на параметры связывания антибиотиков: связывание рифампицина (на 62 % в лимфоцитах и 90 % в полиморфно-ядерных лейкоцитах), доксициклина (на 50 % в обоих случаях) и цефтриаксона (на 33 и 10 % соответственно) возрастает; при этом связывание азитромицина и эритромицина в условиях нашего эксперимента не изменялось. В тех же условиях эксперимента клетки здоровых людей мало реагировали на присутствие в среде инкубации арглабина: связывание антибиотиков лимфоцитами не менялось вообще, из 4 антибиотиков только в случае с цефтриаксоном показатель связывания полиморфно-ядерными лейкоцитами увеличивался на 36 %.

Полученные данные позволяют предполагать возможность включения сесквитерпенового лактона арглабин в число препаратов, апробируемых в системе лечения СПИД-ассоциированных заболеваний. Необходимо дальнейшее, более подробное исследование возможности влияния арглабина на проницаемость клеточных мембран.

#### *М. В. Мезенцева<sup>1</sup>, А. Ж. Абильдаева<sup>2</sup>, С. М. Адекенов<sup>2</sup>* **Влияние сесквитерпенового лактона арглабин на цитокиновый статус в условиях *in vitro***

<sup>1</sup> *НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН, Москва*

<sup>2</sup> *Институт фитохимии МОН РК, Караганда, Казахстан*

**Цель исследования.** Изучить влияние сесквитерпенового лактона арглабин (АН) на цитокиновый статус в условиях *in vitro*.

**Материал и методы.** Проведено исследование цитокинового профиля у 12 больных ревматоидным артритом (РА) и у 12 относительно здоровых добровольцев без аутоиммунных и системных заболеваний в динамике до и после воздействия АН в дозе 4–8 мг/мл на клетки крови обследованных. В исследованиях была использована стандартная методика определения ИФН-статуса.

**Результаты.** У относительно здоровых добровольцев АН в исследуемых концентрациях (в большей степени — 4 мкг/мл) влиял на экспрессию генов цитокинов следующим образом: повышалось количество выявленных мРНК ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 в 42 % случаев, ИЛ-10 — в 83 % случаев, ИЛ-18, TGF- $\beta$  и ИЛ-1 $\beta$  — в 17 % случаев; снижалось количество выявленных мРНК ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, NF- $\kappa$ раВ в клетках крови 17–33 % добровольцев и мРНК TGF- $\beta$  — у 58–67 % обследованных, т. е. у относительно здоровых добровольцев под воздействием АН (4 мкг/мл), подобно препарату ридостин, можно предполагать активацию экспрессии генов цитокинов, вырабатываемых Th1- и Th2-лимфоцитами. АН в исследуемых концентрациях воздействовал на экспрессию генов цитокинов в клетках крови больных РА практически так же, как и в клетках доноров, за исключением того, что в большей степени повышалось количество выявленных мРНК NF- $\kappa$ раВ и TGF- $\beta$ . Данные, полученные в ходе исследования параметров состояния системы цитокинов у больных РА при воздействии АН на клетки крови *in vitro*, могут свидетельствовать о его высокой иммунокорректирующей способности у данной группы больных. Чувствительность к АН была выше у больных РА, чем у относительно здоровых добровольцев. Наилучший потенциальный терапевтический эффект АН проявлял в дозе 8 мг/мл.

**Выводы.** Исходя из полученных данных, можно предполагать, что у относительно здоровых добровольцев применение АН (4 мкг/мл) может вызывать индукцию генов цитокинов, вырабатываемых Th1- и Th2-лимфоцитами, т. е., по-видимому, препарат может быть использован для профилактики ряда заболеваний. Полученные данные указывают на то, что использование АН в дозе 4 мкг/мл у больных РА может приводить к активации генов цитокинов, вырабатываемых Th1- и Th2-лимфоцитами, а также фактора противоопухолевой защиты NF- $\kappa$ раВ и супрессорного цитокина TGF- $\beta$ .

#### *М. В. Мезенцева<sup>1</sup>, А. Ж. Абильдаева<sup>2</sup>, С. М. Адекенов<sup>2</sup>* **Исследование влияния сесквитерпенового лактона арглабин и гидрохлорида его иметиламинопроизводного на интерфероновый статус в условиях *in vitro***

<sup>1</sup> *НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН, Москва*

<sup>2</sup> *Институт фитохимии МОН РК, Караганда, Казахстан*

**Цель исследования.** Изучить влияние сесквитерпенового лактона арглабин (АН) и гидрохлорида его диметиламинопроизводного (ГДА) на интерфероновый статус в условиях *in vitro*.

**Материал и методы.** Проведено исследование интерферонового (ИФН) статуса у 12 больных *in vitro* ревматоидным артритом (РА) и у 12 относительно здоровых добровольцев в динамике до и после воздействия АН на клетки крови обследованных. Использована стандартная методика определения ИФН-статуса с изучением следующих показателей: продукция ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , уровень циркулирующего ИФН в плазме крови, спонтанно продуцируемого ИФН, уровень чувствительности к препаратам ридостин, циклоферон, АН и ГДА в 2 концентрациях (4 и 8 мкг/мл) уровень чувствительности к препаратам ИФН- $\alpha$  (с использованием прайминг-эффекта).

**Результаты.** В результате исследований ИФН-статуса и цитокинового профиля больных РА установлено изначальное нарушение ряда показателей иммунитета у обследованных пациентов. Выявлены отклонения от нормы: повышение спонтанно вырабатываемого ИФН, косвенный показатель аутоиммунных процессов, снижение способности к продукции ИФН- $\alpha$ , показателя функциональной активности В-лимфоцитов и состояния противовирусной защиты организма. Снижение способности к продукции ИФН- $\gamma$ , показателя функциональной активности Т-лимфоцитов и способности к активации иммунной системы зарегистрировано у 60 % обследованных. Отмечено снижение чувствительности к химиопрепаратам: ридостин (33 % больных), циклоферон (50 % пациентов), амиксин (8 % больных), АН (17–33 % пациентов) и ГДА (33–50 % обследованных), снижение чувствительности к препаратам ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$  — в 50–60 % случаев. Наблюдается повышение ИФН- $\alpha$ - и ИФН- $\gamma$ -ингибирующей активности сыворотки крови у 40 и 50 % пациентов соответственно. Следует отметить, что чувствительность к препаратам АН и ГДА была выше у больных РА, чем у относительно здоровых добровольцев без аутоиммунных и системных заболеваний. При этом наибольший потенциальный терапевтический эффект препараты проявляли в дозе 8 мг/мл.

**Выводы.** Данные, полученные в ходе исследования параметров состояния системы интерферона у больных ревматоидным артритом при воздействии АН и ГДА на клетки крови *in vitro*, могут свидетельствовать об их высокой иммунокорригирующей способности у данной группы больных.

*И. М. Омарова, Л. Е. Муравлева, В. В. Койков*  
**Состояние окислительного метаболизма у больных первичным раком печени на фоне монотерапии арглабином**

*Карагандинская государственная медицинская академия МЗ РК, Казахстан*

**Цель исследования.** Изучение влияния арглабина на окислительный метаболизм крови больных первичным раком печени (ПРП).

**Материал и методы.** Объектом исследования служила кровь 74 больных ПРП IV стадии. Выделено три группы больных: 1-я получила химиотерапию (ХТ), 2-я — монотерапию арглабином и 3-я — ХТ с арглабином. Арглабин вводили внутривенно в дозе 185 мг/м<sup>2</sup>, всего 15 инъекций. До и после лечения определяли показатели спонтанной окислительной модификации белков (ОМБ), степень фрагментации белков при спонтанной окислительной модификации, уровень средних молекул, а также кислоторастворимые фракции (КРФ) нуклеиновых кислот и гистоноподобные белки.

**Результаты.** При ПРП выявлено достоверное увеличение катаболитов ОМБ в плазме крови, степени фрагментации белков и аккумуляции средних молекул в эритроцитах, высокий уровень КРФ, изменения соотношения гистоноподобных белков. После ХТ содержание всех катаболитов ОМБ и средних молекул было не только достоверно выше нормы, но и превосходило таковые до лечения. Монотерапия арглабином оказала более выраженное позитивное действие на содержание катаболитов ОМБ. После ХТ с арглабином выявлена отчетливая тенденция к снижению содержания катаболитов ОМБ основного и нейтрального характера, средних молекул. После ХТ в плазме крови больных ПРП все показатели фрагментации белков достоверно превышали значения нормы. Выявлена тенденция к снижению этих показателей после монотерапии арглабином. Отмечено достоверное снижение показателей степени фрагментации белков после ХТ с арглабином. После ХТ и монотерапии арглабином содержание КРФ в крови больных ПРП продолжало достоверно превышать значение контроля. После ХТ с арглабином на-

блюдалось выраженное снижение содержания КРФ. Эти показатели были ниже, чем при назначении ХТ и монотерапии арглабином. После сочетанного применения химиотерапии и арглабина у больных ПРП наблюдалось выраженное перераспределение соотношения типов гистоноподобных белков. Так, при одновременном достоверном росте содержания фракции гистонов Н1 достоверно снижается суммарная фракция гистонов Н2А, Н3, Н4. Зафиксирована также выраженная тенденция к снижению гистонов Н2В.

**Выводы.** Монотерапия арглабином и особенно его применение в комплексе с химиопрепаратами ограничивают нарушения биохимических процессов, что выражается в снижении степени интоксикации у больных первичным раком печени.

*Г. А. Омарова, Л. Б. Айтишева*  
**Экспериментальное изучение терапевтической эффективности арглабина на модели радиационного поражения у крыс**

*Карагандинская государственная медицинская академия МЗ РК, Казахстан*

**Введение.** Исследуемый препарат арглабин выделен из полины гладкой, эндемичной для Казахстана. Получен в Институте фитохимии МОН РК (Караганда) под руководством проф. С. М. Адекенова. В ранее опубликованных нами работах сообщалось, что введение данного препарата в профилактическом режиме (за 3 дня до облучения) увеличивало выживаемость облученных животных до 65 %, а средняя продолжительность жизни (СПЖ) повышалась в 3,7 раза относительно контроля (облученные животные без введения препарата). Уменьшалась степень истощения циркулирующего пула клеток крови, в значительной степени сохранялась способность гемопозитических клеток к репарации. Арглабин также оказывал стабилизирующий эффект на состоянии окислительного метаболизма, калликреин-кининовой системы (ККС) и показатели тиреоидного гомеостаза.

**Цель исследования.** Оценить возможность фармакологической коррекции (лечебно-профилактический режим введения) препарата арглабин при исследованиях метаболических процессов на мембрано-молекулярном уровне организма при воздействии гамма-облучения.

**Материал и методы.** Модель радиационного поражения (РП) воспроизводили путем острого тотального облучения крыс-самцов массой 180–200 г на гамма-установке «Рокус» (<sup>60</sup>Co) в дозе 8 Гр мощностью 1,5 Гр/мин. Препарат вводили в виде 2% водного раствора внутривенно из расчета 10 мг на 1 кг массы животного.

**Результаты и выводы.** Установлено, что введение препарата арглабин в лечебно-профилактической дозе (3 дня до и 10 дней после облучения) увеличивало выживаемость облученных животных до 77 % (относительно контроля), повышало СПЖ до 19 сут, способствовало ускорению процессов восстановления периферической крови в более поздние сроки, оказывало позитивное действие на состояние окислительного метаболизма, снижая интенсивность ПОЛ и повышая АОЗ; приводило к повышению уровня трийодтиронина и тетраiodтиронина. Это, по-видимому, должно способствовать некоторой стабилизации процессов, пролонгированию гомеостаза и пролиферативных процессов в органах и тканях, более активному формированию адаптивных реакций, участвующих в снижении последствий биологического действия радиации.

*В. Б. Сирота, Г. О. Олжатаева, С. С. Альжанов*  
**Лучевая терапия с арглабином в лечении рака шейки матки**

*Карагандинская государственная медицинская академия МЗ РК, Казахстан*

*КГКП «Карагандинский областной онкологический центр», Казахстан*

*Институт фитохимии МОН РК, Караганда, Казахстан*

**Цель исследования.** Оценка непосредственных результатов применения арглабина при лучевой терапии (ЛТ) рака шейки матки (РШМ).

**Материал и методы.** В исследование включено 22 больных РШМ. Средний возраст пациенток составил 47,1 лет, со II стадией рака — 14 больных, с III стадией — 6 и с I стадией — 2. Выделено

две группы больных. 1-я группа — 10 пациенток РШМ, получавших сочетанное лучевое лечение. Курс дистанционной гамма-терапии проводился в режиме классического фракционирования по 2 Гр 5 раз в неделю на аппаратах «Рокус-АМ» и «АГАТ-Р» до суммарной очаговой дозы 40–46 Гр + внутрисполостная ЛТ по 4 укладки препаратами кобальта 1 раз в неделю до суммарной дозы в точке А 65–85 Гр. Эти больные составили группу контроля. Хирургическому лечению подверглись все 7 пациенток через 2–3 нед. после окончания ЛТ. 2-я группа — 12 больных РШМ, которым в комбинированное лечение включен курс монотерапии арглабином при сочетанной ЛТ. Арглабин вводили из расчета 185 мг/м<sup>2</sup> в виде 2% раствора внутривенно за 15–20 мин до сеанса ЛТ. Количество введений арглабина — 15–20, суммарная доза варьировала от 3600 до 8000 мг. Из этой группы 10 больных подверглись оперативному вмешательству. Оценку непосредственного объективного эффекта терапии проводили по методике, предложенной ВОЗ (1978). Цитологически в динамике оценивали степень дистрофических изменений опухолевых клеток, определяли выраженность лучевого повреждения опухоли.

**Результаты.** Изучение непосредственного клинического эффекта ЛТ показало, что ее эффективность у больных, получавших дополнительно арглабин, несколько выше по сравнению с группой без арглабина. Средний объем опухоли до лечения в группе пациенток, получавших ЛТ без арглабина, составил 120,2 см<sup>3</sup>, в группе, получавших дополнительно арглабин, — 144,8 см<sup>3</sup>. В 1-й группе больных объем опухоли уменьшился в 1,2 раза, во 2-й — в 1,9 раза (с 144,8 до 74,4 см<sup>3</sup>). При анализе цитогрaмм, взятых в середине ЛТ у больных, дополнительно получавших арглабин, выявлены признаки дисплазии, дистрофии и лизиса опухолевых клеток у 10 пациенток, чего не наблюдали у больных контрольной группы. Постлучевой патоморфоз опухоли III степени выявлен у 3 больных в группе, получавших арглабин, и ни у одной больной в контрольной группе.

**Выводы.** Выявлено положительное влияние арглабина на непосредственные результаты комбинированного лечения РШМ.

*В. Б. Сирота, К. Ж. Мусулманбеков, Н. В. Бочкова,  
Е. В. Кострова*

### Применение арглабина как радиомодификатора при раке пищевода

*Карагандинская государственная медицинская академия МЗ РК,  
Казахстан  
КТКП «Карагандинский областной онкологический центр»,  
Казахстан*

**Цель исследования.** Оценить эффективность применения арглабина при лучевой терапии (ЛТ) динамическим фракционированием дозы у больных раком пищевода (РП).

**Материал и методы.** Проанализированы результаты лечения 40 больных РП. Средний возраст больных составил 64,7 года, со II стадией опухолевого процесса — 18 больных, с III — 22. 50 % больных получали ЛТ динамическим фракционированием: первые 3 дня РОД — 4,5 Гр, далее методом мультифракционирования: РОД 1,2 Гр 2 раза в день с интервалом в 4,5 ч до СОД, эквивалентной 60–68 Гр классического фракционирования. Остальным 50 % пациентов ежедневно перед утренним сеансом вводили внутривенно 2% раствор арглабина из расчета 185 мг/м<sup>2</sup>. Общее количество инъекций арглабина — 20. Суммарная доза препарата варьирует от 4000 до 9000 мг. Оценку непосредственного клинического эффекта проводили согласно рекомендациям ВОЗ.

**Результаты.** В исследуемой группе больных полный регресс опухоли отмечен в 7 (35±10,7 %) случаях, частичный регресс — в 10 (50±11,2 %), стабилизация процесса — в 3 (15±8,0 %), ни у одного больного не было прогрессирования опухоли. В контрольной группе больных, получавших ЛТ динамическим фракционированием дозы без арглабина, полная регрессия достигнута у 4 (20±8,9 %) больных, частичная — у 10 (50±11,2 %), стабилизация — у 6 (30±10,2 %). Положительный клинический эффект в исследуемой группе наблюдали

у 85 % больных, в контрольной — у 70 %. Средний объем опухоли до лечения составил в контрольной группе 7,6±0,3 см<sup>3</sup>, после лечения — 3,5±0,3 см<sup>3</sup>; в основной группе до лечения — 9,6±0,2 см<sup>3</sup>, после лечения — 2,9±0,3 см<sup>3</sup>. У больных, получавших ЛТ с арглабином, опухоль уменьшилась в 3,3 раза, у больных контрольной группы — в 2,2 раза ( $p \leq 0,001$ ). Необходимо отметить лучшую клиническую переносимость лучевого лечения при использовании арглабина. При контрольном рентгенологическом исследовании пищевода через 2–3 мес. после ЛТ в исследуемой группе больных у 15 из 20 пациентов контуры пищевода ровные, без дефектов наполнения и сужения. В контрольной группе пациентов аналогичная рентгенологическая картина наблюдалась только у 9 больных.

**Выводы.** Применение арглабина в монорежиме у больных РП повышает эффективность ЛТ динамическим фракционированием дозы на 15 % и требует дальнейшего изучения.

*Е. М. Тажбаев<sup>1</sup>, Е. В. Тихонова<sup>2</sup>, М. Ж. Буркеев<sup>1</sup>,  
С. М. Адекенов<sup>2</sup>*

### Перспективы применения полимеров для создания новых лекарственных форм препарата арглабин

*<sup>1</sup> Карагандинский государственный университет им. Е. А. Букетова,  
Казахстан*

*<sup>2</sup> Институт фитохимии МОН РК, Караганда, Казахстан*

**Введение.** В течение последних 100 лет наука о полимерах прошла развитие от спорной теории о существовании макромолекул до применения в форме сложных систем в медицине. Из спектра общих концепций фармакологической активности полимеров одной из наиболее перспективных является конструирование противоопухолевых препаратов на полимерной основе в виде наночастиц и нанокapsул. Оригинальным противоопухолевым препаратом растительного происхождения является арглабин, применяемый для химиотерапевтического лечения злокачественных опухолей печени, легких, молочной железы и яичников.

**Цель исследования.** Создание новых лекарственных форм арглабина, обеспечивающих его пролонгированное действие и целенаправленный транспорт в орган-мишень.

**Результаты.** Разработан эмульсионный способ получения полимерных наночастиц, иммобилизованных арглабином. В качестве полимерной основы испытаны известные виниловые мономеры метилметакрилат, этилакрилат, акриловая кислота и др., а также новые дивиниловые и винилацетиленовые мономеры. Медико-биологические испытания показали, что индивидуальные полимеры не обладают противоопухолевой активностью в отношении клеток карциномы Н157 и меланомы НТ144. Однако при включении в состав арглабина наблюдается значительное повышение противоопухолевого эффекта. Наиболее перспективным является полимер на основе β-винилоксиэтиламида акриловой кислоты, из матрицы которого арглабин диффундирует, не теряя своей физиологической активности. Наряду с отсутствием цитотоксичности это свидетельствует о его нейтральности. Новый полифункциональный дивиниловый мономер — β-винилоксиэтиламид акриловой кислоты (β-ВОЭА АК) получен из дешевого и доступного сырья. Физические и физико-механические свойства полимеров β-ВОЭА АК можно направленно изменять в широких пределах благодаря наличию в структуре мономера неравнозначных по активности двух двойных связей. В состав макромолекул β-ВОЭА АК входят связи -CO-NH-, идентичность строения которых с пептидной группой белков, возможно, и будет определять биосовместимость полимеров. Нами установлено, что гидролиз -CO-NH- связи в молекулах гомо- и сополимеров β-ВОЭА АК протекает значительно быстрее в присутствии некоторых ферментов. Этот процесс регулируется содержанием в цепи звеньев β-ВОЭА АК и зависит от внешних условий среды. Таким образом, появляется возможность решения проблемы деградации и вывода полимерного носителя из организма.

# РАЗНОЕ

Г. Н. Апрышко<sup>1</sup>, Н. К. Клаан<sup>2</sup>

## Комплекс электронных информационных ресурсов по ангиогенной терапии опухолей

<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>2</sup> ВИНТИ РАН, Москва

**Цель исследования.** Сформировать комплекс взаимосвязанных электронных ресурсов для использования в исследованиях по созданию ангиогенных средств лечения злокачественных опухолей.

**Материал и методы.** Разработанный ранее классификатор биологических мишеней действия средств лекарственного лечения злокачественных опухолей. Система управления базами данных ISIS/BASE. Компьютерная программа прогноза спектра биологической активности химических соединений по их структурной формуле PASS.

**Результаты.** Разработана компьютерная база данных формата ISIS/BASE по низкомолекулярным веществам, взаимодействующим с молекулярными мишенями действия ангиогенных противоопухолевых лекарств. Существенной частью базы данных является используемый при заполнении иерархического текстового поля «мишень действия» список нормализованных терминов, составленный на основе гипертекстового документа, содержащего синонимы, выходящие и нижестоящие термины. Одна часть базы данных заполняется информацией из публикаций, обрабатываемых в реферативном журнале ВИНТИ «Онкология». Вторая часть предназначена для хранения данных о новых, в т. ч. виртуальных, веществах, для которых с помощью системы PASS предсказан спектр действия на структурные, рецепторные, информационные и ферментативные молекулы, вовлеченные в процессы ангиогенеза и лимфангиогенеза. Имеется возможность пополнения записей о новых веществах экспериментальными данными о влиянии на ангиогенез, цитотоксической и противоопухолевой активности. Разработан пользовательский интерфейс для регистрации предсказанных и полученных экспериментально данных о биологической активности веществ в виде текстовых таблиц, которые затем импортируются в базу данных формата ISIS/BASE. Подготовлен алгоритм формирования на основе разработанной базы данных обучающих массивов для предсказания с помощью системы PASS биологической активности веществ в пределах определенных химических классов.

**Выводы.** Описанный комплекс электронных информационных ресурсов рекомендуется для использования в исследованиях по анализу связи «структура — активность», направленных на открытие новых противоопухолевых препаратов ангиогенного действия.

Н. В. Балацкая<sup>1</sup>, К. А. Парсункова<sup>1</sup>, Н. А. Гольдина<sup>1</sup>,  
И. А. Гандурина<sup>1</sup>, Л. Б. Краснова<sup>1</sup>, С. Г. Кузьмин<sup>1</sup>,  
Г. Н. Ворожцов<sup>1</sup>, Н. Н. Петенко, И. Н. Михайлова<sup>2</sup>,  
Ю. А. Барышников<sup>2</sup>

## Состояние антиоксидантной системы у больных меланомой кожи

<sup>1</sup> ГУП МНКЦ «Интермедбиофизхим», Москва

<sup>2</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Проявлением нарушения метаболических функций при злокачественных опухолях является активация реакций свободнорадикального окисления, которая может быть и причиной, и следствием нарушения баланса прооксидантных и антиоксидантных систем организма. Накопление высокотоксичных продуктов перекисного окисления липидов в конечном итоге приводит к нарушению структуры и функциональной организации клеточных систем, в частности дезинтеграции эндоплазматического ретикулума и мембран митохондрий, ингибированию синтеза важных биохимических соединений. Данные изменения приводят к возникновению побочных токсических эффектов и осложнений. Изучение динамики активности свободнорадикальных реакций и состояние антиоксидантной системы представляется особенно актуальным в клинике для оценки эффективности терапии.

Целью работы явилось определение содержания в сыворотке крови продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), общего ан-

тиоксидантного статуса (TAS) — интегрального показателя, отражающего суммарное содержание всех элементов с антиоксидантной активностью в сыворотке крови. Определялась активность внутриклеточных ферментов в эритроцитах крови супероксиддисмутазы (COD) и глутатионпероксидазы (GPx).

Для исследования и оценки эффективности проводимой терапии были выбраны пациенты с меланомой кожи.

В зависимости от проводимого курса лечения было сформировано три группы. 1-ю группу из 6 человек составили больные, получавшие адаптогенный, обладающий антиоксидантным действием препарат кордицепс в течение 70 дней. В этой группе исследования проводились до и после окончания курса лечения. Во 2-ю группу вошло 8 пациентов, проходящие курс вакцинотерапии с препаратом аллоген (ИБГ РАН). 3-ю группу из 18 человек составили находившиеся на терапии аутологичными дендритными клетками (ИБГ РАН). Во 2-й и 3-й группах исследования проводились до и через 78 дней после начала лечения.

Полученные в ходе исследования результаты показывают изначально низкий уровень TAS во всех 3 группах. После курса терапии кордицепсом у пациентов 1-й группы наблюдалось некоторое повышение TAS до нижнего уровня нормы, у пациентов 2-й и 3-й групп изменение этого показателя носило разнонаправленный характер: повышение до нормы наблюдалось у 75 % больных 2-й группы и у 73 % — 3-й. Уровень продуктов ПОЛ повысился у 40 % пациентов 1-й группы практически до верхнего предела нормы, также у 66 % больных 2-й группы и у 38 % пациентов 3-й группы.

Активность COD во всех 3 группах до лечения была низкой. Изменения после лечения носили также разнонаправленный характер: в 1-й группе оставались на нижней границе нормы, во 2-й — у 60 % больных, а в 3-й группе у 33 % отмечалось снижение активности этого показателя

Отмечены также следующие изменения активности GPx в эритроцитах: снижение активности фермента у 60 % больных 1-й группы в конце лечения по сравнению с исходным уровнем; во 2-й группе также у 60 % наблюдается снижение GPx, но от изначально нормального уровня; в 3-й группе у 43 % больных отмечено повышение до нормальных величин, а у 57 % — понижение до нижних границ нормы.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о сформированном в организме онкологических больных дисбалансе прооксидантных и антиоксидантных факторов в сторону нарушения активности первичных внутриклеточных и вторичных систем антиоксидантной защиты. Незначительные изменения в ходе проводимого лечения указывают на сохранение существующего дисбаланса.

Полученные данные в ходе лечения пациентов с меланомой кожи позволяют сделать вывод о значимости показателей антиоксидантного статуса организма, их информативности в клинических исследованиях, позволяющих объективно оценить эффективность проводимой терапии и дающих возможность вовремя вносить необходимые коррективы.

А. Брашосс

## Эффективность витамина С — Инъектопас® 7,5 г в адъювантной терапии карциномы молочной железы

Фирма PASCOE, Гисен, Германия

С ноября 2003 по август 2004 г. из 32 онкологических центров Германии были собраны данные по 788 пациенткам с карциномой молочной железы, получавшим лечение с 1992 по 2002 г. В обследование входили больные с первоначальной, неметастазирующей карциномой молочной железы, а также больные с прогрессирующей карциномой молочной железы. Пациенток разделили на две группы: 1-я (получавшая витамин С — Инъектопас®) — 409 больных, 2-я (контрольная) — 379. Все больные были прооперированы. 1-я группа получала Инъектопас® в дозе 7,5 г в пре- или послеоперационном периоде внутривенно капельно максимально до 4 раз в неделю на протяжении 8–10 нед. 2-й группе никакой терапии с витамином С не проводилось.

Вероятность риска побочных явлений (тошнота и рвота ( $p < 0,0001$ ), отсутствие аппетита ( $p < 0,0001$ ), желудочно-кишечные симптомы ( $p < 0,0001$ ), головная боль ( $p = 0,0031$ ), усталость, слабость и истощение ( $p < 0,0001$ ), нарушение сна ( $p = 0,0008$ )) при обычной противоопухолевой терапии у пациенток в 1-й группе была значительно ниже, чем во 2-й ( $p < 0,0001$ ; OR=0,31). У больных 1-й группы общее и психическое состояние по ECOG и индекс Карновского были клинически и статистически лучше, что снизило необходимость домашнего ухода ( $p < 0,001$ ) и повторной госпитализации ( $p < 0,001$ ). В этой же группе был меньше риск прогрессирования опухоли ( $p = 0,01$ ) или ее рецидива ( $p = 0,004$ ).

Адьювантная терапия высокими дозами витамина С значительно улучшает качество жизни онкологических больных.

*И. Г. Гатауллин, Н. Ф. Сайфуллин, А. И. Тихонов*  
**Роль металлов в генезе колоректального рака**

*Казанская государственная медицинская академия*

**Цель исследования.** Оценка роли металлов в генезе колоректального рака.

**Материал и методы.** Проведено исследование заболеваемости населения Республики Татарстан (РТ) злокачественными новообразованиями прямой и ободочной кишки и конкретные характеристики среды обитания — содержание в почве и растениях тяжелых металлов. Изучено содержание тяжелых металлов в сыворотке крови 120 доноров и в тканях опухоли 138 удаленных препаратов прямой и ободочной кишки. Исследования металлов в почве и биологических тканях проводили методом атомно-абсорбционной спектроскопии на аппаратах OPTIMA 2000 DV и ELAN 6000.

**Результаты.** Составлены картограммы, в которых представлены показатели заболеваемости и содержание металлов в почве и растениях. Обработка полученных результатов методом регрессионного анализа и канонической корреляции позволила установить достоверное влияние высокого содержания в почве и растениях хрома и никеля на уровень заболеваемости населения колоректальным раком (коэффициент корреляции 0,56 и 0,45). В ряде районов РТ с высоким содержанием в почве хрома и никеля исследовали методом атомно-абсорбционной спектроскопии содержание этих элементов в крови у доноров. Результаты исследования показали наличие высокого (более чем в 1,5–2 раза) содержания в сыворотке крови хрома и никеля. Учитывая возможное влияние этих элементов на канцерогенез, изучили содержание этих металлов в удаленных во время операции препаратах прямой и ободочной кишки. Проведенные исследования показали наличие более высокого содержания в тканях опухоли хрома и никеля по сравнению с тканью интактной кишки.

**Выводы.** Высокая концентрация в почве хрома и никеля влияет на заболеваемость населения колоректальным раком. Допустимо предположить, что связывание канцерогенных металлов (хрома и никеля) с некоторыми участками гена может вызывать последующие мутации или активацию онкогенов. Этот процесс можно рассматривать как начальный этап канцерогенеза колоректального рака, индуцированного металлами.

*Ф. И. Комаров, Т. А. Гуськова, Л. М. Чувильская, З. В. Елисеева*  
**Особенности этической экспертизы материалов клинических исследований противоопухолевых лекарственных средств**

*Комитет по этике при Федеральном органе контроля качества лекарственных средств, Москва*

Особенность этической экспертизы материалов клинических исследований (КИ) противоопухолевых препаратов обусловлена, с одной стороны, достаточно высокой токсичностью онкологических препаратов, с другой — менталитетом российского человека, который часто расценивает онкологический диагноз как приговор. С целью обеспечения максимально возможной безопасности пациентов с онкологическим заболеванием, участвующих в КИ с достаточно высоким потенциальным риском для здоровья, Комитетом по этике проводится тщательный анализ представляемых на этическую экспертизу документов. Учитывая высокую токсичность противоопухолевых препаратов, 1-я фаза клинического исследования, когда препарат впервые применяется у человека, проводится с участием

пациентов с онкологическими заболеваниями, а не на здоровых добровольцах. Это накладывает дополнительную нагрузку на больного человека. В связи с этим в Протоколе КИ должны быть предусмотрены жесткие критерии отбора пациентов, в частности резкое ограничение или невключение в исследование пациентов, у которых при скрининговом обследовании обнаружены изменения в органах и системах, которые были наиболее чувствительны к изучаемому препарату в доклинических токсикологических исследованиях. Экспертный анализ диапазона выбранных доз противоопухолевого средства на 1-ю фазу осуществляется с учетом его токсичности на животных. Особое внимание обращается на необходимость внесения в Протокол КИ всех токсических эффектов, в т. ч. и выявленных у животных. Обязательным условием оценки безопасности при проведении КИ является мониторинг функционального состояния органов и систем, в которых были обнаружены негативные эффекты в доклинических и клинических исследованиях.

Информация для пациента с онкологическим заболеванием должна содержать все присущие этому документу сведения. В нее обязательно включаются все токсические и побочные эффекты, связанные с приемом препарата, а также данные о заболевании, о предполагаемом риске и пользе, о правах и обязанностях пациента и другая необходимая информация. Однако специфической особенностью информации для этой категории больных должен быть, прежде всего, взвешенный, корректный, нетравмирующий стиль изложения. Описание ожидаемой пользы от участия в КИ не должно давать пациентам оснований для необоснованных надежд. С точки зрения этического и врачебного принципа «не навреди» в информации для россиянина с онкологическим заболеванием нежелательно использовать такие травмирующие термины, как рак, саркома, заменив их терминами опухоль, новообразование.

*И. Г. Меерович, В. В. Жердева, Л. П. Арсланбаева, А. П. Савицкий*

**Получение опухолевой клеточной линии мелкоклеточного рака легкого человека OAT-75, стабильно экспрессирующей красный флуоресцирующий белок DsRed2**

*Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва*

**Введение.** Цветные флуоресцирующие белки (FPs) — уникальные генетические маркеры для изучения молекулярных процессов в живых, постоянно развивающихся клетках и организмах. FPs могут быть гетерологически экспрессированы в любых клетках, а для появления флуоресцентного сигнала от этих белков не требуются никаких дополнительных ферментов или кофакторов. Стабильно трансфицированные клеточные линии эффективно используются в онкологических исследованиях и при изучении взаимодействия патоген — хозяин при поиске новых лекарств, позволяя проводить непрерывный визуальный мониторинг злокачественного роста и распространения опухоли в организме животных без необходимости анестезии, инъекции субстрата, контрастирующих агентов. Появление белков, флуоресцирующих в оранжево-красном спектральном диапазоне при возбуждении в синей и сине-зеленой области, позволило существенно увеличить глубину наблюдения.

**Материал и методы.** В работе использовали красные флуоресцирующие белки DsRed2. Клетки клеточной линии мелкоклеточного рака легкого человека OAT-75 подвергали липосомальной трансфекции плазмидной ДНК (pDsRed2-C1, Clontech, США), содержащей ген устойчивости к неомицину. Плазмида предварительно была наработана в штамме DH5 $\alpha$  *E. coli*, выделена и очищена с концентрацией на выходе 0,1–0,5 мкг/мкл. комплексы липосомальных агентов с плазмидной ДНК получали в соответствии с рекомендациями их производителей. Время инкубации клеток с этими комплексами варьировало в пределах 6–24 ч. Исследование экспрессии DsRed2 и оценку эффективности трансфекции проводили через 24 ч после начала трансфекции на инвертированном флуоресцентном микроскопе Bio Star (Германия). Далее проводили селекцию трансфицированных клеток в присутствии антибиотика генетицина (антибиотик G418, аналог неомицина) в концентрации от 400 до 1200 мкг/мл в течение 7–14 дней. индивидуальные клоны флуоресцирующих клеток выделяли методом предельного разведения в лунках 96-луночного планшета. Затем нарабатывали клеточную массу. Исследо-



вали свойства полученных индивидуальных клонов флюоресцирующих клеток: скорость удвоения, стабильность экспрессии DsRed2.

**Выводы.** Полученные клоны OAT-75, экспрессирующие DsRed2, не отличаются от исходных клеток по времени удвоения.

*Н. А. Плотникова, Г. М. Веснушкин, А. З. Альмяшев*  
**Влияние мелатонина на канцерогенез на модели уретан-индуцированных опухолей легких у мышей SHR/u**

*ГОВУПО Мордовский государственный университет  
им. Н. П. Огарева, медицинский факультет, Саранск*

**Цель исследования.** Изучить влияние мелатонина при введении в разных дозах на развитие опухолей легких, индуцированных уретаном у мышей.

**Материал и методы.** Эксперимент был поставлен на 128 аутобредных белых мышах SHR/u массой 20–22 г в возрасте 3 мес. Канцерогенез легких моделировался однократным интраперитонеальным введением уретана в дозе 1 г/кг. Коррекция канцерогенеза проводилась мелатонином в дозе 2 и 20 мг/л. Животные опытных групп получали мелатонин ежедневно перорально с питьевой водой с 19.00 до 7.00 часов. Экспозиция составила 6 мес., после чего животные забивались путем декапитации. У животных в легочной ткани определяли частоту развития опухолей, множественность и размеры опухолевых узлов. Производился анализ дозовой зависимости действия мелатонина.

**Результаты.** Через 6 мес. у 100 % животных контрольной группы возникали множественные опухоли легких. Среднее число опухолей на 1 животное составило  $23 \pm 2,628$ . Количество опухолевых узлов малого размера ( $\leq 0,5$  мм) составило  $8,692 \pm 0,904$ , среднего размера (0,6–1 мм) —  $10,885 \pm 2,245$ , крупных узлов ( $> 1$  мм) —  $3,423 \pm 0,647$ .

В группах животных, получавших мелатонин, опухоли возникали также в 100 % случаев. При введении мелатонина в дозе 20 мг/л среднее число опухолей на животное достоверно уменьшалось на 37,6 % и составило  $14,360 \pm 1,203$  ( $p < 0,01$ ). Среднее число опухолей малого, среднего и крупного размера на 1 животное составило соответственно  $8,960 \pm 0,937$  (на 3,1 % больше по сравнению с контролем;  $p > 0,05$ ),  $3,760 \pm 0,433$  (на 65,5 % меньше, чем в контроле;  $p < 0,01$ ) и  $1,647 \pm 0,318$  (на 52,1 % меньше, чем в контроле;  $p < 0,05$ ).

При введении мелатонина в дозе 2 мг/л общее среднее число опухолей достоверно уменьшилось на 52,2 % и составило  $11,0 \pm 0,748$  ( $p < 0,001$ ). Среднее число опухолей малого, среднего и крупного размера на 1 животное составило соответственно  $7,077 \pm 0,592$  (на 18,6 % меньше, чем в контроле;  $p > 0,05$ ),  $3,462 \pm 0,448$  (на 68,2 % меньше, чем в контроле;  $p < 0,01$ ) и  $0,462 \pm 0,149$  (на 86,5 % меньше, чем в контроле;  $p < 0,001$ ).

**Выводы.** Введение мелатонина значительно уменьшает множественность опухолей легких, индуцированных уретаном у мышей, не влияя на частоту их развития. При коррекции мелатонином достоверно уменьшается среднее общее число опухолевых узлов, преимущественно за счет узлов крупного и среднего размера. Вероятно, выраженное подавляющее влияние мелатонина на канцерогенез обусловлено уменьшением скорости роста опухолей — следствие прямого цитостатического действия данного гормона.

Важным моментом является выявление дозовой зависимости в действии мелатонина: эффект малой дозы (2 мг/л) выражен более значительно, чем эффект большой дозы (20 мг/л).

*Г. М. Сафонова<sup>1</sup>, В. П. Катаев<sup>2</sup>, В. С. Швец<sup>2</sup>*  
**Применение препаратов олексин и биостим для улучшения качества жизни больных с распространенными формами злокачественных опухолей**

<sup>1</sup> Филиал ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ Пермское НПО «Биомед»

<sup>2</sup> Пермская ГМА Росздрава

В работе представлены материалы по оценке влияния препаратов олексин и биостим на качество жизни больных с распространенными формами злокачественных новообразований. Олексин и биостим — отечественные препараты, разработанные в Пермском НПО «Биомед». Олексин — очищенный водный экстракт из листьев персика, содержащий комплекс полифенольных веществ, в т. ч. флаво-

ноиды, проявляющий антиоксидантную, иммуномодулирующую, адаптогенную активность. Исследования, проведенные в ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, показали, что препарат олексин при профилактическом применении до трансплантации опухоли задерживает развитие аденокарциномы молочной железы мышей.

Препарат биостим содержит натриевую соль ДНК, выделенную из бычьих семенников. При пероральном применении биостим проявляет выраженные иммуномодулирующую активность и эритропоэстимулирующее действие, значительно повышает мышечную и силовую выносливость.

В исследование включено 68 онкологических больных в возрасте от 20 до 84 лет (45 человек старше 60 лет). Среди наблюдаемых пациентов опухолевые поражения по стадиям представлены следующим образом: IIIa стадия — 2 больных, IIIb стадия — 21, IV стадия — 45. Из них 47 пациентов не оперированы ввиду IV стадии рака и тяжелого состояния на фоне множественных метастазов.

До начала приема олексина у всех больных отмечены признаки прогрессирования симптомов опухолевой интоксикации. Больные получали симптоматическую терапию.

Олексин, назначаемый 3 раза в сутки в дозе 7–10 капель натощак, купирует проявления астеновегетативного и диспептического синдромов, повышает физическую активность больных, обладает хорошим обезболивающим эффектом, благотворно влияет на нервную систему, нормализует сон и настроение больных, увеличивает безрецидивный промежуток жизни больных.

Препарат биостим назначали онкологическим больным при лейкопении ( $2-2,5 \times 10^9/\text{л}$ ) по 1–2 таблетки 2 раза в день. Через 2–4 нед. приема препарата количество лейкоцитов у этих больных достигало  $6-8 \times 10^9/\text{л}$ .

*Т. А. Сидорова<sup>1</sup>, И. С. Северина<sup>2</sup>, Н. А. Пятакова<sup>2</sup>,  
А. Ю. Щеголев<sup>2</sup>, И. В. Чинарева<sup>1</sup>, Г. К. Герасимова<sup>1</sup>,  
О. Л. Калия<sup>3</sup>, Г. Н. Ворожцов<sup>3</sup>*

**Растворимая гуанилатциклаза (рГЦ) — молекулярная мишень терафтала и антрациклиновых антибиотиков**

<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>2</sup> Институт биологической и медицинской химии им. В. Н. Ореховича РАМН, Москва

<sup>3</sup> ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Москва

**Введение.** Прием противоопухолевых препаратов нередко сопровождается рядом гемодинамических реакций организма. Так, у некоторых больных при лечении антрациклиновыми антибиотиками отмечается повышение артериального давления, митоксантроном — снижение свертываемости крови. Изучаемый в настоящее время препарат терафтал (ТФ) — компонент каталитической системы «ТФ+АК» — вызывает гипотензивный эффект и снижение некоторых показателей свертываемости крови у больных. Известно, что фармакологическая активация рГЦ нитровазодилаторами и аналогами гема вызывает снижение тонуса гладкой мускулатуры сосудов и изменяет агрегационные свойства тромбоцитов.

**Цель исследования.** Оценить влияние ТФ и доксорубина на базальную активность рГЦ; сопоставить с действием известных модуляторов активности фермента-активатора (нитропруссид натрия, SNP) и ингибиторов ODQ и LY83583.

**Материал и методы.** Растворимую гуанилатциклазу выделяли из разрушенных тромбоцитов крови здоровых доноров путем ультрацентрифугирования. Каталитическую активность фермента определяли по методу Мурада и соавт. Содержание цГМФ, синтезированного рГЦ, определяли с помощью фермент-связанного иммуносорбентного метода (ELISA), используя коммерческие наборы фирмы Bioimmunogen (Россия). Агрегацию тромбоцитов изучали с помощью турбидиметрического метода Борна. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали АДФ ( $12,5$  мкМ).

**Результаты.** При исследовании влияния препаратов на базальную активность рГЦ выявлено, что в присутствии ТФ наблюдается активация фермента в 2–4 раза. Кривая активации фермента зависела от концентрации ТФ в диапазоне  $10^{-9}$ – $10^{-4}$  М и имела выраженный колоколообразный характер, что свидетельствует о наличии на ферменте двух мест связывания препарата. Максимальная активация фермента наблюдалась при концентрации ТФ  $10^{-6}$  М, после чего

отмечалось снижение активности до базального уровня. Таким образом, ТФ является активатором рГЦ наряду с известными стимуляторами ее активности (SNP и YC-1). В отличие от ТФ антрациклиновые антибиотики (доксорубин, даунорубин) оказались ингибиторами базальной активности рГЦ. При исследовании агрегации тромбоцитов человека *in vitro* было установлено, что в присутствии ТФ (10 мкМ) агрегационная способность АДФ снижалась на 50 %.

Можно предположить, что выявленные побочные эффекты ТФ (гипотония, снижение свертываемости) и антрациклинов (гипертензия) могут быть обусловлены их разнонаправленным действием на рГЦ (активация фермента ТФ и ингибирование его активности антрациклинами).

**Выводы.** Растворимая гуанилатциклаза является молекулярной мишенью терафтала и антрациклиновых антибиотиков.

*Работа выполнена при финансовой поддержке НТП «Разработка и внедрение в медицинскую практику новых методов диагностики и лечения онкологических и других заболеваний» и гранта РФФИ № 050448577.*

*Т. И. Солнцева<sup>1</sup>, Т. И. Сухова<sup>1</sup>, Г. К. Герасимова<sup>1</sup>,  
О. Л. Калия<sup>2</sup>, Г. Н. Ворожцов<sup>2</sup>*

### **Стехиометрия связывания терафтала с 1-адренорецепторами опухолевых клеток**

<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>2</sup> ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Москва

**Введение.** В течение последних лет проводится изучение биохимических механизмов действия бинарной каталитической системы «терафтал (октанатриевая соль окта-4,5-карбоксилфталацианин кобальта) + аскорбиновая кислота» («ТФ+АК») — нового подхода к лечению злокачественных опухолей. При клинических испытаниях выявлена чувствительность к «ТФ+АК» некоторых нейрэндокринных опухолей (феохромоцитомы, злокачественный карциноид), а при введении ТФ наблюдались такие побочные эффекты, как снижение артериального давления и некоторых показателей свертываемости крови. Подобные эффекты могут быть обусловлены взаимодействием ТФ с рецепторами (Рц) нейромедиаторов, широко представленными на клеточной мембране как нормальных, так и опухолевых клеток. Следствием этого могут быть нарушения взаимодействия Рц с природными лигандами, изменения активности Рц-опосредованных сигнальных путей и клеточного ответа на специфический нейромедиатор.

**Задачи исследования.** 1. Выявить на поверхности опухолевых клеток гепатомы крысы McARH7777 и аденокарциномы яичника человека CaOv 1-адренорецепторы (1-АРц) и определить их кинетические характеристики. 2. Проверить возможность прямого связывания терафтала с 1-АРц и выявить стехиометрию этого процесса. 3. Исследовать функциональную активность 1-АРц: сопряженность 1-АРц с системой вторичных мессенджеров (цГМФ).

**Результаты.** Радиолигандным методом было установлено, что на мембране опухолевых клеток крысиной гепатомы McARH 7777 и аденокарциномы яичника человека CaOv существуют 1-АРц. Эти сайты были охарактеризованы, рассчитаны величины констант диссоциации (Kd) и максимальное количество мест связывания на клетку (Bmax) для 3Н-празозина — специфического блокатора 1-АРц. Установлено, что ТФ конкурировал с 3Н-празозином за общие места связывания, локализованные на поверхности клеток обеих опухолей. Полученные значения Kd и Bmax для ТФ совпадали с таковыми для празозина. Совместное добавление к клеткам празозина и терафтала выявило отсутствие аддитивности. Эти факты позволили сделать вывод об идентичности празозиновых мест связывания ТФ и 1-АРц. Характеристики исследуемых Рц были рассчитаны по методу Скотчарда, исходя из предположения, что 1 Рц связывает 1 молекулу лиганда. Однако из литературы известно, что Рц в определенных условиях способны присоединять 2 молекулы лиганда. Для уточнения стехиометрии изучаемого процесса все экспериментально полученные кривые специфического связывания были проанализированы по одно- и двухсайтовым моделям связывания с помощью компьютерной программы Graphpad Prism Software (version 4, San Diego, CA, USA). Результаты анализа подтвердили односайтовый механизм взаимодействия ТФ с 1-АРц клеток гепатомы и аденокарциномы и неприменимость данного процесса к двухсайтовой

модели. Таким образом, стехиометрия связывания ТФ с 1-АРц на поверхности опухолевых клеток составляет 1:1. Исследование сопряженности Рц ТФ с системой гуанилатциклазы показало, что добавление ТФ к опухолевым клеткам вызывало увеличение внутриклеточного уровня цГМФ. Специфический блокатор 1-АРц празозин блокировал активацию гуанилатциклазы.

**Выводы.** ТФ связывается с физиологически активными (сопряженными с гуанилатциклазой) клеточными 1-АРц в соотношении 1:1. Следствием этого связывания может быть антипролиферативный эффект, реализующийся в блокировании митогенного сигнала; гипотензивный эффект на уровне организма в результате конкуренции ТФ с катехоламинами, гиперпродукция которых характерна для феохромоцитомы.

*М. Н. Тарелкина, Н. К. Разумова, Б. И. Джурко*

### **Комплексное лечение больных со злокачественными опухолями**

*Санкт-Петербургский государственный НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе*

С целью улучшения оказания квалифицированной медицинской помощи онкологическим больным разработаны оригинальные методики лечения больных со злокачественными опухолями и сформирован комплекс терапевтических мероприятий в сочетании с оперативным вмешательством, применение которого оказалось эффективным у больных с опухолями III и IV стадии. Комплекс состоит из следующих компонентов: хирургического лечения (как правило, паллиативного характера), цитостатиков, дерината (нативной дезоксирибонуклеиновой кислоты) или ронколейкина, антиканцерогена (селена), использования ЭМИ (магнитно-резонансная терапия) и метода экстракорпоральной перфузии донорской свиной селезенки. Работа включает результаты обследования 106 больных с запущенными формами опухолей III и IV стадии (аденокарцинома) различной локализации (колоректальный, легкие, молочная железа, яичники, поджелудочная железа). Характер опухоли и метастазов во всех наблюдениях верифицирован морфологически. Контроль состоял в оценке статуса жизнедеятельности по шкале ZEW, клинических и биохимических показателей крови, контроля крови на раковый антиген, данных КТ и УЗИ, аппаратно-программного комплекса «Омега». Разработанная в институте комбинированная тактика оперативного и медикаментозного лечения запущенных форм (IV стадия) привела к увеличению продолжительности жизни этих больных до 2–3 лет. Продолжительность жизни умерших пациентов с IV стадией опухоли от начала заболевания — от 0,5 до 4 лет. Как хороший результат терапии следует считать устранение болевого синдрома. Так, у 70 % больных, которым проведено более 2 курсов лечения, боль прекратилась или уменьшилась. Из противоболевых препаратов наркотические анальгетики были полностью исключены ввиду отсутствия их необходимости. Качество жизни улучшилось у 80 % пациентов.

*Е. В. Хорошева<sup>1</sup>, Г. К. Герасимова<sup>1</sup>, С. А. Борисенкова<sup>2</sup>,  
Е. Г. Гиренко<sup>2</sup>, О. Л. Калия<sup>3</sup>, Г. Н. Ворожцов<sup>3</sup>*

### **Каталитические системы как источник внутриклеточных свободных радикалов**

<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>2</sup> МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

<sup>3</sup> ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Москва

**Введение.** Противоопухолевые бинарные каталитические системы (БКС), основанные на усилении окисления аскорбиновой кислоты (АК) катализаторами — органическими соединениями кобальта: синтетическим препаратом терафтал (ТФ) (окта-4,5-карбоксилфталацианин кобальта) и природным соединением оксикобаламином (ОК), проходят II фазу клинических испытаний. В основу разработки этого подхода к терапии опухолей положена гипотеза о генерации в опухолевой клетке свободных радикалов кислорода, обладающих цитотоксическим действием. Действительно, в модельных химических системах установлена способность ТФ окислять АК с образованием высокореактивных радикалов кислорода: O<sup>•</sup>, OH<sup>•</sup> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Однако не было известно о возможности БКС генерировать радикалы внутри опухолевых клеток, обладающих мощными антиоксидантными системами.

**Цель исследования.** Оценка влияния БКС на базальный уровень свободных радикалов в опухолевых клетках, установление зависимости цитотоксического эффекта БКС от уровня генерации внутриклеточных СР.

**Материал и методы.** БКС: «ТФ+АК», «ОК+АК», «эфитер+АК» в соотношении концентраций компонентов 1:10. Культуры клеток карциномы яичника человека CaOv и клетки асцитного рака Эрлиха (штамм ELD), растущие в среде RPMI-1640 с добавлением 10% FBS. В культуральную среду вносили БКС или их отдельные компоненты и инкубировали клетки в течение 2 ч в CO<sub>2</sub>-термостате при температуре 37 °С, после чего определяли внутриклеточные свободные радикалы (СР) с помощью флюоресцентного зонда H<sub>2</sub>DCFDA. Цитотоксическое действие БКС оценивали МТТ-тестом через 48 ч после воздействия на клетки БКС.

**Результаты.** Установлено, что при действии изученных БКС в опухолевых клетках повышается уровень СР. Более эффективными продуцентами СР являются каталитические системы на основе ОК и ТФ, повышающие уровень СР в 1,5–2 раза. Определяющими факторами в образовании СР являются концентрация катализатора и его соотношение с концентрацией АК. Превышение оптимальной концентрации АК снижает генерацию СР и цитотоксическое действие «ТФ+АК». Уровень образования СР прямо коррелирует с цитотоксичностью БКС. Исследования последних лет показали, что активные формы кислорода (ROS) могут быть регуляторными медиаторами физиологического ответа клетки. Например, повышение внутриклеточного уровня ROS может приводить не только к снижению репликативной способности клеток, но и к повышению активности эффекторных клеток иммунитета, изменению редокс-регуляции мембрано-рецепторного сигнала. В этом аспекте будут обсуждены данные, полученные при клинических и экспериментальных исследованиях каталитической системы «ТФ+АК».

*Работа выполнена в рамках ФНТП «Разработка и практическое освоение в здравоохранении новых методов и средств профилактики, диагностики и лечения онкологических, инфекционных и других опасных заболеваний».*

*М. Я. Шапкина, М. В. Максимова, И. Р. Просалкова,  
Н. А. Хабарова, А. В. Сергеев*

**Чаговит: химико-фармацевтические исследования**  
ГУ РОНЦ им Н. Н. Блохина РАМН, Москва

**Введение.** Чаговит — новый препарат на основе чаги. Препараты чаги давно используются в онкологии в качестве популярного лечебно-профилактического средства. Чага содержит в своем составе лабильные полифенольные соединения (хромогенный комплекс, дубильные вещества, биофлавоноиды), а также лектины, птериновые и тритерпеновые соединения, макро- и микроэлементы (в т. ч. Mg, Mn, Zn, Cu). Чага обладает антиоксидантными, противовоспалительными, биорегулирующими свойствами.

**Цель исследования.** Разработать оригинальный препарат чаги для перорального применения, стабильный при хранении.

**Материал и методы.** Поскольку препарат предназначался в качестве лечебно-профилактического средства для массового потребления, основной принцип, которым мы руководствовались при разработке, — минимум вспомогательных веществ и технологических манипуляций, снижающих стабильность действующих веществ

и качество препарата. Выбраны капсулы как наиболее приемлемая форма выпуска. Для повышения эффективности в состав препарата кроме сухого экстракта чаги и порошка чаги включены жизненно важные витамины С и группы В (В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>с</sub>) в дозах, не превышающих суточных потребностей, дефицит которых испытывает 60–90 % населения страны.

**Результаты.** Разработаны технология производства капсул чаговит в блистерной упаковке, методы анализа, параметры и критерии контроля качества и стандартизации капсул. В качестве основных показателей стандартизации используются: масса содержимого капсул, описание внешнего вида, растворимость, реакции подлинности, содержание витамина С, хромогенного комплекса, суммарное количество полифенольных соединений, что характеризует антиоксидантную активность препарата. В предварительных доклинических и клинических испытаниях в группах онкологического риска показано наличие у чаговита иммуномодулирующих, противовоспалительных, антиоксидантных и других свойств.

**Выводы.** Чаговит в капсулах разрешен для применения в качестве общеукрепляющего, детоксицирующего средства, для повышения качества жизни, коррекции иммунного статуса и обмена веществ и как дополнительный источник витаминов С, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>с</sub>. Регистрационное удостоверение № 005870.Р.643.07.2003.

*О. П. Шейченко<sup>1</sup>, О. А. Бочарова<sup>2</sup>, В. И. Шейченко<sup>1</sup>,  
О. Н. Толкачев<sup>1</sup>, Е. В. Бочаров<sup>3</sup>, И. В. Казеев<sup>2</sup>, В. А. Быков<sup>1</sup>*  
**Применение разностных электронных спектров поглощения в анализе комплексного препарата фитомикс-40**

<sup>1</sup> ВИЛАР, Москва

<sup>2</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>3</sup> ГУ НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва

Препарат фитомикс-40 — фитоадаптоген с иммуномодулирующей, антиоксидантной, интерферогенной, антиметастатической и радиопротекторной активностью. Включает экстракты 40 видов различных растений. С целью выявления перспектив использования электронных спектров поглощения для характеристики и анализа этого препарата проведено сравнительное изучение обычных и разностных УФ-спектров в присутствии AlCl<sub>3</sub> в качестве реагента сдвига, который образует комплексы с биологически активными фенольными соединениями.

Предпосылкой использования УФ-спектроскопии в исследовании водно-спиртовых экстрактов растений является возможность проведения анализа без пробоподготовки, т. к. применяемые растворители прозрачны в исследуемой области спектра.

В результате проведенных исследований выявлено, что разностные спектры 28 экстрактов, поглощающие в области 260–320 и 370–430 нм, имеют не более 3 максимумов. В разностных спектрах 12 экстрактов максимумы отсутствуют. В отличие от обычных спектров разностные спектры с использованием реагента сдвига оказываются существенно более четкими и характеристичными. Совпадения разностных спектров изучаемых растений не наблюдается, в результате чего их можно считать диагностическими.

Таким образом, использование разностной УФ-спектроскопии перспективно для проведения экспресс-анализа водно-спиртовых экстрактов, входящих в фитомикс-40, а также для их характеристики и стандартизации.

# СТЕНДОВЫЕ СООБЩЕНИЯ

## ПРОЛОНГИРОВАННАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА ПРОСПИДИНА

*С. А. Беляев (Минск)*

## ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИМЕРНОЙ ФОРМЫ ЦИСПЛАТИНА ДЛЯ ЛОКАЛЬНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ РАЗЛИЧНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ГОЛОВЫ И ШЕИ

*П. М. Бычковский (Минск)*

## ЛОКАЛЬНАЯ ХИМИОТЕРАПИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА С ПРИМЕНЕНИЕМ ПОЛИМЕРНОЙ ФОРМЫ ТЕМОЗОЛОМИДА

*Д. П. Веевник (Минск)*

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ NO-ДОНОРОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННО- УСТОЙЧИВЫХ ОПУХОЛЕЙ

*С. А. Гончарова, Т. А. Раевская (Черноголовка)*

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА РЕЖИМА ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ЛИЗИСА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

*Е. С. Коваленко (Смоленск)*

## ОЦЕНКА СОЧЕТАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ С ФОТОСЕНСОМ И ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ НА ОПУХОЛЯХ МЫШЕЙ

*И. Ю. Кубасова, З. С. Смирнова, Л. М. Борисова, М. П. Киселева,  
Г. А. Меерович, А. А. Вайнсон, В. В. Мещерикова, Н. Н. Касаткина,  
А. Ю. Барышников, Е. А. Лукьянец, Г. Н. Ворожцов (Москва)*

**ФУЛЛЕРИЛНИТРАТЫ КАК АДЬЮВАНТЫ ЦИТОСТАТИЧЕСКОЙ  
ХИМИОТЕРАПИИ**

*И. И. Файнгольд, Е. С. Фрог, Д. В. Мищенко (Черноголовка)*

**АКТИВАЦИЯ КАСПАЗНОЙ СИСТЕМЫ В КЛЕТКАХ  
ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИНДУКЦИИ  
АПОПТОЗА АЛКАЛОИДАМИ ХЕЛИДОНИНОМ И  
САНГВИНАРИНОМ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ  
АПОПТОЗИНДУЦИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ АЛКАЛОИДОВ  
ЧИСТОТЕЛА НА КЛЕТКИ ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА  
ЧЕЛОВЕКА**

*А. А. Фильченков (Киев)*

**ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИМЕРНОЙ ФОРМЫ ТЕМОЗОЛОМИДА НА  
ОСНОВЕ ВЫСОКОЗАМЕЩЕННОГО ФОСФАТА ДЕКСТРАНА**

*Н. К. Юркитович (Минск)*

УДК 577.352.2:615.015

*E. V. Tolcheva, N. A. Oborotova*

## LIPOSOMES AS THE CARRIERS FOR DELIVERY OF BIOLOGICALLY ACTIVE MOLECULES

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

### ABSTRACT

Liposomes, microscopic phospholipid bubbles with a bilayer membrane structure, are the subject of great interest as carriers for delivery of drug, proteins, peptides, DNA, antisense oligonucleotides. Attachment of ligands promoting the selective binding of antigen or receptor to cell surface furthers the targeting delivery of liposomes to cell. The choice of targeting ligand depends on antigen/receptor expressed on the cell surface.

**Key words:** liposomes, PEG-liposomes, ligands for targeting transport, drug delivery.

*E. V. Толчева, Н. А. Оборотова*

## ЛИПОСОМЫ КАК ТРАНСПОРТНОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ДОСТАВКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ

*ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*

### РЕЗЮМЕ

Липосомы — микроскопические фосфолипидные везикулы, образованные одной или несколькими бислоями мембранами, — вызывают большой интерес как транспортное средство для доставки химиопрепаратов (антибиотиков, цитостатиков, фотосенсибилизаторов), белков, пептидов, ДНК, антисмысловых олигонуклеотидов. Присоединение к поверхности липосом лигандов, способных специфически связываться с антигенами или рецепторами на поверхности клетки, обеспечивает направленный транспорт липосом к клетке-мишени. Выбор лиганда зависит от антигена/рецептора, экспрессированного на поверхности клетки, куда необходимо доставить липосомы.

**Ключевые слова:** липосомы, пэгилированные липосомы, лиганды для направленного транспорта, доставка лекарственных препаратов.

### ВВЕДЕНИЕ

Первоначально липосомы использовались как модельные системы биологических мембран для научных исследований. Фосфолипиды и другие амфифильные молекулы способны самостоятельно формировать бислои липидных мембран (БЛМ), отделяющие внутреннее пространство липосомы от внешней среды. БЛМ по многим параметрам сходны с клеточными мембранами, что дает возможность использовать их в качестве моделей для изучения структуры и функций последних, а также внутримембранного белок-липидного взаимодействия. На сегодняшний день липосомы широко используются как транспортное средство для доставки множества биологически активных молекул, таких как ДНК, олигонуклеотиды, белки, пептиды и различные лекарственные препараты (антибиотики, цитостатики и др.).

Липосомальные системы доставки широко применяются в противоопухолевой терапии, т. к. способствуют повышению терапевтического эффекта и снижению токсичности лекарственного препарата по сравнению с его свободной формой. В настоящее время ряд липосомальных препаратов успешно применяется в клинике (табл. 1). Первоначальный успех, достигнутый в работе с липосомальными формами многих лекарственных препаратов, послужил толчком для дальнейших клинических исследований. Так, например, результатом применения противоопухолевого препарата доксорубицина, включенного в пэгилированные липосомы, для лечения больных метастатическим раком молочной железы стало увеличение продолжительности жизни [13; 30; 40]. Положительные результаты были получены при комбинированной терапии, состоящей из доксила и цисплатина [29], мице-

та и паклитаксела [48] или келикса и карбоплатина [10]. Клинические исследования показали впечатляющий результат при терапии кожной Т-клеточной лимфомы [57] и саркомы [49] доксорубицином в пэгиллированных липосомах в сравнении со свободным препаратом.

Таблица 1.

### Липосомальные лекарственные препараты, разрешенные для клинического применения

Препарат	Производитель	Активное вещество	Структура	Показания
Амбисам/ AmBisome	Gilead (NeXstar)	Амфотерицин Б	Липосомы	Грибковые инфекции
Абелсет/ AB EL CET	Gilead (NeXstar)	Амфотерицин Б	Липосомы	Грибковые инфекции
DaunoXome	Gilead (NeXstar)	Даунорубин	Липосомы	Саркома Капоши
Доксил/Doxil	Alza (Sequus)	Доксорубин	ПЭГ-липосомы	Саркома Капоши, рак яичников, рецидивирующий рак молочной железы
Келикс/Caelyx	Schering-Plough	Доксорубин	ПЭГ-липосомы	Рецидивирующий рак молочной железы
Мицет/Myocet	Elan (TLC)	Доксорубин	Липосомы	Рецидивирующий рак молочной железы
Алтраген/ Altragen	—	Ретиноевая кислота	Липосомы	Острый миелоидный лейкоз, неходжкинская лимфома, саркома Капоши, почечно-клеточная карцинома
Нитрен/ Nyotran	—	Нистатин	Липосомы	Грибковые инфекции
NX211	—	Lurtotecan/ Луртотекан	Липосомы	Рак яичников
—	—	Annamycin	Липосомы	Доксорубин-резистентные опухоли

## ЭВОЛЮЦИЯ МЕТОДА ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

### Пассивный транспорт (ненаправленные липосомы)

Первое поколение липосом, так называемые классические липосомы, имело один существенный недостаток — быстрый захват и удаление из кровотока липосомальных препаратов клетками ретикулоэндотелиальной системы, что затрудняло доставку препаратов к опухоли. Классические липосомы, к поверхности которых были присоединены антитела, обладали аналогичным недостатком. Для увеличения времени циркуляции липосом в кровотоке было предложено покрыть поверхность липосом инертными биосовместимыми полимерами, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ), которые формируют защитный слой и препятствуют распознаванию белками плазмы крови (опсонинами) и, следовательно, дальнейшему клиренсу [22].

Включение противоопухолевых препаратов в пространственно стабилизированные липосомы увеличи-

вает их накопление в тканях с повышенной проницаемостью сосудов. Наличие прерывистого эндотелия и другие капиллярные аномалии, найденные в сосудистой сети опухоли во время неоангиогенеза, способствуют проникновению липосом во внутритканевое пространство солидных опухолей и их накоплению, где они действуют как система, непрерывно высвобождающая лекарственный препарат [59]. Это явление получило название эффект повышенной проницаемости сосудов (EPR-effect) [31]. В последнее время пространственно стабилизированные липосомы подробно изучаются и широко используются в биомедицинских исследованиях *in vitro* и *in vivo*; они нашли также применение в клинической практике [10; 13; 30; 29; 40; 48; 49; 57].

Важным свойством защитных полимеров является их гибкость, которая позволяет относительно небольшому количеству присоединенных молекул создавать непроницаемый слой на липосомальной поверхности. Несмотря на то что ПЭГ по-прежнему остается лидером среди защитных полимеров, продолжают попытки найти другие соединения, которые могли бы быть использованы для получения пространственно стабилизированных липосом. Описано приготовление пространственно стабилизированных липосом с применением поли[N-(2-гидроксипропил)метакриламида] [56], поли-N-винилпирролидонов [53], биорасщепляемых полимер-липидных конъюгатов [39] и поливинилового спирта [50].

Роль липосом в противоопухолевой терапии не ограничивается доставкой лекарственных препаратов. Известно, что липосомы также могут быть использованы в борозахватывающей терапии (boron neutron capture therapy — BNCT) для селективной доставки терапевтических количеств атомов  $^{10}\text{B}$  в опухолевые клетки [25].

### Активный транспорт (направленные липосомы)

Несмотря на достигнутые результаты в использовании ненаправленных липосомальных систем доставки лекарственных препаратов, были проведены исследования с целью повышения эффективности и селективности действия липосомальных противоопухолевых препаратов посредством лиганд-опосредованного транспорта липосом. Это достигается присоединением направляющих векторных молекул к поверхности липосом. Лиганды способствуют селективному связыванию с опухолеассоциированными антигенами или рецепторами и доставке лекарственных препаратов непосредственно к месту их назначения. В качестве векторных молекул могут выступать, например, моноклональные антитела (MкА) или их фрагменты (Fab'-фрагменты MкА), пептиды, лиганды к специфическим рецепторам на поверхности клеток-мишеней и др.

Первые эксперименты были осуществлены посредством простой иммобилизации антитела и ПЭГ на поверхности одной и той же липосомы. Однако выяснилось, что защитный полимер может создавать пространственные препятствия для специфического свя-

звания антител с клеткой-мишенью [51]. Для достижения большей избирательности пэгилированных липосом было решено присоединять векторную молекулу к дистальному концу ПЭГ, чтобы лиганд находился снаружи плотной щетки полимера. В настоящее время используются различные современные технологии для присоединения лиганда к дистальному концу активированного ПЭГ-липидного конъюгата, встроенного в липосомы [1; 3]. Липосомы, к поверхности которых присоединены МкА или Fab'-фрагменты МкА, называли иммунолипосомами. Большинство принципов, применимых для иммунолипосом, также может быть использовано для липосом, модифицированных другими лигандами. С помощью направленных липосом могут быть селективно доставлены не только противоопухолевые низкомолекулярные препараты, но и макромолекулы, включая белки, пептиды, антисмысловые олигонуклеотиды и ДНК.

### ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ ЛИПОСОМ

Для получения пространственно стабилизированных липосом, способных избирательно связываться с антигеном или рецептором на поверхности клеток-мишеней, необходимо ковалентно присоединить к их поверхности полимеры для защиты от действия ретикулоэндотелиальной системы и специфические лиганды для направленной доставки липосом к клеткам — белки, пептиды и другие молекулы. Методика присоединения основана на трех реакциях, которые являются достаточно эффективными и избирательными: 1) реакция между активированными карбоксильными группами и аминоклассами, в результате которой образуется амидная связь; 2) реакция между пиридилдитиолами и тиолами, в результате чего образуются дисульфидные связи; 3) реакция между малеимидными производными и тиолами, в результате которой формируются тиоэфирные связи [12]. Существуют и другие подходы, например образование карбаматной связи посредством реакции между *p*-нитрофенилкарбонильной и аминоклассами [52]. Кроме того, для присоединения лигандов к липосомальной поверхности используется метод нековалентного связывания — через образование комплекса биотин — авидин/стрептавидин [12; 47].

### ЛИГАНДЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО ТРАНСПОРТА ЛИПОСОМ

*Антиген-опосредованный транспорт липосом (направленный транспорт липосом с помощью моноклональных антител или Fab'-фрагментов моноклональных антител)*

Моноклональные антитела или Fab'-фрагменты моноклональных антител часто используются для направленной терапии, в т. ч. для направленного транспорта липосом. Несмотря на то что первоначальные исследования были направлены на применение целых молекул антител в качестве направляющего вектора, в последнее время все большее внимание уделяется

Fab'-фрагментам как векторам, обладающим пониженной иммуногенностью и улучшенными фармакокинетическими параметрами. Важным преимуществом использования этого класса лигандов является возможность выбора фрагмента антитела, обладающего наиболее высокой аффинностью к клетке-мишени.

Анти-CD34 моноклональные антитела Му10, направленные против антигена CD34, экспрессированного на поверхности лимфоцитов при остром миелоидном лейкозе, были использованы для получения Му10-иммунолипосом [5; 38]. В экспериментах *in vitro* была доказана избирательная доставка доксорубина, включенного в Му10-иммунолипосомы [5]. Биотинилированные ОХ26-иммунолипосомы (ОХ26-моноклональные антитела, направленные против трансферринового рецептора крысы) специфически связывались с трансферриновым рецептором клеток поперечнополосатых мышц в экспериментах *in vitro* [47]. Интересно, что для селективной доставки доксорубина к опухолевым клеткам лекарственный препарат доксил был модифицирован моноклональными антителами 2С5 против нуклеосом [28].

Доксорубин, как и большинство химиопрепаратов, является низкомолекулярным соединением, способным проникать в клетку путем пассивной диффузии. Однако для достижения большего терапевтического эффекта при доставке лекарственного средства с помощью иммунолипосом необходима интернализация антигена после связывания с антителом, как было показано, например, с клетками В-лимфомы и интернализирующимися эпитопами (CD19) [43]. Интересная концепция была разработана для доставки анти-HER-2-иммунолипосом к опухолевым клеткам, на поверхности которых экспрессирован антиген HER-2 [41].

Было показано, что при лечении группы мышей BALB/c с ксенотрансплантатами человеческой лимфомы Беркитта (клеточная линия Namalwa) анти-CD19(целые МкА)-иммунолипосомами, нагруженными доксорубином, и анти-CD19(Fab'-фрагменты МкА)-иммунолипосомами, нагруженными доксорубином, терапевтический эффект во втором случае был выше вследствие более длительной циркуляции иммунолипосом в кровотоке [44]. Fab'-фрагменты и целые антитела, направленные против ганглиозида GD<sub>2</sub>, экспрессированного на поверхности клеток нейробластомы, были ковалентно присоединены к пэгилированным липосомам. Эффективность направленной доставки доксорубина с помощью иммунолипосом была проверена в экспериментах *in vitro* на GD<sub>2</sub><sup>+</sup>-клетках нейробластомы и *in vivo* на голых бестимусных мышях (Nude). Было показано полное ингибирование метастазов нейробластомы человека на модели голых бестимусных мышей при терапии Fab'-иммунолипосомами, нагруженными доксорубином [42].

### Рецептор-опосредованный транспорт липосом Фолат-опосредованный транспорт липосом

Рецептор фолата (рецептор фолиевой кислоты, РФК) представляет собой присоединенный к гликозилфосфатидилинозитолу гликопротеин, который свя-



зывается с фолиевой кислотой и интернализует ее внутрь клетки путем рецептор-опосредованного эндоцитоза. Фолатные рецепторы экспрессированы на опухолевых клетках при раке яичников, толстой кишки, молочной железы, легких, почечно-клеточной карциноме, метастазах эпителиальных опухолей в головной мозг и нейроэндокринной карциноме. Липосомы, модифицированные фолиевой кислотой, и нагруженные доксорубицином, проявили более высокий цитотоксический эффект в экспериментах *in vitro* на РФК<sup>+</sup>-клеточной линии по сравнению с ненаправленными липосомами, нагруженными тем же препаратом [8]. Было установлено, что возможна направленная доставка макромолекул, а также липосом в живые клетки с помощью РФК-опосредованного эндоцитоза, позволившая преодолеть множественную лекарственную устойчивость [11; 27]. Липосомный даунорубин, так же как и доксорубин, был доставлен в различные опухолевые клетки посредством фолиевой кислоты, при этом было показано увеличение цитотоксического эффекта [11]. Липосомы, модифицированные фолиевой кислотой, были предложены как транспортное средство для доставки антисмысловых олигонуклеотидов [23], а также генетического материала [15] в опухолевые клетки.

#### *Трансферрин-опосредованный транспорт липосом*

Рецептор-опосредованный эндоцитоз комплекса трансферринового рецептора и трансферрин-связанного железа — основной путь транспорта железа в клетку. Рецепторы трансферрина экспрессированы на поверхности множества опухолевых клеток, и поэтому антитела, направленные против трансферрина, так же как и сам трансферрин, являются популярными лигандами для транспорта липосом к опухолевым клеткам. Были проведены исследования по присоединению трансферрина к полиэтиленгликолю на поверхности пэгиллированных липосом для доставки лекарственных препаратов в солидные опухоли [18]. Антитела против трансферрина [58] были использованы для доставки генетического материала в клетки посредством катионных липосом. Трансферрин-опосредованная доставка липосом также успешно применялась для доставки к клеткам головного мозга. Иммунолипосомы, содержащие OX26-моноклональные антитела против трансферринового рецептора крысы, были использованы для доставки к эндотелиальным клеткам микрососудов мозга [16].

#### *Интегрин-опосредованный транспорт липосом*

Известно, что рост опухоли сопровождается образованием новых кровеносных сосудов (ангиогенезом). На поверхности эндотелиальных клеток активированных сосудов среди прочих белков экспрессированы интегринные рецепторы  $\alpha_v\beta_3$  и  $\alpha_v\beta_5$  (табл. 2). Они обеспечивают адгезию эндотелиальных клеток к внеклеточному матриксу через последовательность Arg-Gly-Asp (RGD).

Несколько матриксных белков, содержащих RGD-последовательность, играют критическую роль в ангиогенезе и, следовательно, являются потенциальной мишенью для терапии, направленной на предотвращение образования новых сосудов.

Таблица 2.

### Белки, экспрессированные на поверхности эндотелиальных клеток при ангиогенезе

CD34	Эндоглин
VEGF-рецептор	Tie2-рецептор
Эндосиалин	TNF- $\alpha$ -рецептор
E-селектин	CD44
$\alpha_v$ -интегрины	Рецептор ангиостатина
MMP-2	Рецептор эндостатина
MMP-9	CM101-связывающий белок

Присоединение RGD-пептида к пэгиллированным липосомам привело к увеличению связывания этих липосом с эндотелиальными клетками пупочной вены человека [46]. С целью предотвращения агрегации тромбоцитов было предложено использовать RGD-липосомы для доставки антикоагулянтов или антитромбоцитарных фармацевтических средств к активированным тромбоцитам. Гипотеза была подтверждена экспериментально, вследствие чего RGD-липосомы могут применяться для избирательной доставки в сердечно-сосудистую систему [24]. Кроме того, пэгиллированные липосомы, нагруженные доксорубицином, были селективно доставлены посредством RGD-пептида к интегринным рецепторам эндотелиальных клеток сосудов опухоли. Было показано увеличение противоопухолевой эффективности доксорубина, включенного в RGD-ПЭГ-липосомы, по сравнению с тем же препаратом, включенным в ненаправленные липосомы, на модели карциномы кишечника линии C26 мыши [44]. Аналогично этому ангиогенный пептид был использован для направленной доставки нагруженных лекарственным препаратом липосом к эндотелию сосудов при экспериментальном лечении опухолей у мышей [2].

#### *Другие лиганды*

Поиск новых лигандов для направленного транспорта липосом сфокусирован на изучении специфических рецепторов и белков-ферментов, синтезируемых в клетках-мишенях (особенно опухолевых клетках). Присоединение ATWLPPR-пептида, обладающего сродством к VEGF-рецептору, к пэгиллированным липосомам привело к увеличению их связывания с эндотелиальными клетками пупочной вены человека [19]. APRPG-пептид, способный специфически связываться с рецепторами эндотелиальных клеток активированных сосудов, конъюгировали с пэгиллированными липосомами для доставки модифицированного бензопорфирина при фотодинамической терапии [17]. NGR-пептид (Asn-Gly-Arg) — лиганд аминопептидазы N (CD13) — был использован для направленной доставки липосомального доксорубина в сосуды опухоли. Кроме того, циклический пептид CNGRCG, конъюгированный с цитокином TNF- $\alpha$ , способствовал направленному транспорту последнего в сосуды опухоли [6]. Липосомы, к поверхности которых были присоединены MкА C225, направленные против рецептора

EGF/EGFvIII, были селективно доставлены к различным опухолевым клеткам, на поверхности которых экспрессирован EGF-рецептор [32]. Известно, что EGF-рецептор экспрессирован на клетках различных солидных опухолей: рак молочной железы, рак легких, глиома, рак толстой кишки и др.

### ЛИПОСОМЫ КАК СРЕДСТВО ДЛЯ ТРАНСПОРТА БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Множество низкомолекулярных лекарственных препаратов проникают в клетку путем пассивной диффузии через клеточную мембрану, но большое количество биологически активных молекул, таких как белки, пептиды и нуклеиновые кислоты, не способны самостоятельно проходить через биологические мембраны. Транспорт этой группы препаратов в цитоплазму полностью зависит от систем доставки, которые обеспечивают их перемещение через мембраны.

#### *Липосомальные белки*

Важным преимуществом использования липосом для лечения злокачественных новообразований и наследственных заболеваний, связанных с неправильным функционированием внутриклеточных ферментов, является возможность заключенных в липосому ферментов проникать в цитоплазму клеток-мишеней [33].

Направленная доставка в одной иммунолипосоме pH-чувствительного дестабилизирующего мембрану diNF-7-пептида слияния и цепи А дифтерийного токсина привела к резкому увеличению цитотоксического эффекта в экспериментах на клетках карциномы яичников. Пептид diNF-7 как в свободной форме, так и инкапсулированный в липосому проявил способность индуцировать слияние мембраны липосомы и эндосомы, обеспечивая тем самым выход липосомального содержимого в цитоплазму [35].

Применение аспарагиназы, заключенной в липосомы, увеличило выживаемость животных с аспарагинзависимыми опухолями P1534 по сравнению со свободным ферментом [9]. Важной особенностью этого метода является то, что инкапсулирование аспарагиназы в липосомы предотвращает выработку антител против аспарагиназы.

Экспериментальная тромболитическая терапия тромбоза яремной вены у кроликов индуктором плазминогена, заключенным в липосомы, показала более высокую степень лизиса по сравнению со свободным нативным ферментом. Для достижения аналогичных результатов потребовалось применить дозу нативного фермента в 4 раза выше, чем липосомального [14].

Применение фосфолипидных пролекарств (предшественников лекарств), встроенных в липосомальные мембраны, по сравнению со свободными препаратами дает несколько преимуществ: высокая эффективность встроенного пролекарства, отсутствие вытекания его из липосом в водную фазу, защищенность от метаболической деградации, возможность использования как препаратов пролонгированного действия [33; 35].

#### *Липосомальные пептиды*

Как известно, липосомы накапливаются преиму-

щественно в печени, что послужило поводом их использования для доставки инсулина. Липосомальный гормон проявил себя как препарат пролонгированного действия за счет увеличения продолжительности циркуляции инсулина в кровотоке и его постепенного высвобождения из липосом, обеспечивая тем самым постоянство его концентрации в крови в течение длительного времени. Фармакодинамика инсулина в пэгиллированных липосомах при внутривенном введении была изучена в экспериментах *in vivo* [20]. Попытка увеличить биодоступность орального липосомального инсулина в экспериментах на животных путем покрытия поверхности липосом полиэтиленгликолем принесла положительные результаты. Эффективность такого метода доставки была подтверждена на крысах [21]. Интерес к липосомальному инсулину как для орального, так и для внутривенного применения остается достаточно высоким.

Другим примером использования липосомальных пептидов стало применение липосомального циклоспорина при трансплантации солидных органов — предупреждение отторжения трансплантата после аллогенной трансплантации комбинированного препарата сердце-легкое. Эффективность применения липосомального циклоспорина в виде аэрозоля показана в экспериментах на собаках. Включение рекомбинантного интерлейкина-2 в липосомы способствовало снижению его токсичности и повышению биологической активности благодаря увеличению продолжительности его циркуляции в крови. Пэгиллированные липосомы также были предложены для орального применения рекомбинантного эпидермального фактора роста человека [7].

### ЛИПОСОМЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Было проведено множество исследований липоплексов, которые представляют собой комплексы катионных и нейтральных липидов и молекул ДНК или антисмысловых олигонуклеотидов. Липоплексы используются в качестве системы для трансфекции клеток [26]. Положительный Z-потенциал катионных липоплексов приводит к их неспецифическому электростатическому взаимодействию с отрицательно заряженной поверхностью клеток. Нейтральные липиды, такие как диолеилфосфатидилэтаноламин, способствуют интернализации и внутриклеточному высвобождению генетического материала.

Присоединение к поверхности липоплекса лиганда, направленного к интернализирующемуся антигену или рецептору, позволяет увеличить эффективность трансфекции. Использование RGD-содержащих липопептидов для получения липоплексов, направленных к интегриновым рецепторам, привело к 100-кратному увеличению эффективности трансфекции ДНК опухолевых клеток, экспрессирующих интегриновые рецепторы [55]. Были получены направленные катионные липосомы для доставки ДНК путем присоединения нейтральных липидов к моноклональным

антителам МОС31. Эти МкА способны специфически узнавать гликопротеин EGP-2, экспрессированный на клетках карциномы. Аналогично были модифицированы моноклональные антитела Herceptin, способные специфически узнавать белок HER-2/neu, экспрессированный на поверхности опухолевых клеток молочной железы и яичников. Применение таких направленных липосом для доставки ДНК привело к увеличению количества трансфицированных клеток [60]. Кроме того, катионные иммунолипосомы, направленные против рецептора трансферрина, были использованы для р53-опухоль-подавляющей генной терапии [58].

В последнее время было предложено использование поликатионных липосом для доставки генетического материала, которые представляют собой липосомы, модифицированные ацелированным полиэтиленгликолем, присоединенным к мембране через ацетильные остатки и связывающим ДНК с помощью положительных зарядов. Такие липосомы демонстрируют высокую степень загрузки ДНК (или другим генетическим материалом) и высокую эффективность трансфекции [34; 37].

### ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ЛИПИДНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ: ВИРОСОМЫ

Цитоплазма клеток является важным, но относительно недоступным компартментом для многих биологически активных макромолекул. Несмотря на то что липосомы широко используются для доставки биологических объектов, до сих пор липосомальная доставка макромолекул, не способных самостоятельно проходить через мембраны, была малоэффективна. Одним из способов повышения эффективности переноса макромолекул в цитоплазму является использование воссозданной оболочки человеческого вируса гриппа А.

Виромы представляют собой передовые, широко применяемые транспортные системы с перспективой использования для терапии опухолей и предотвращения метастазирования, нейродегенеративных изменений и инфекционных заболеваний. Различные биологически активные молекулы, такие как антибиотики, цитостатики, нуклеиновые кислоты, фунгициды и антигены, могут быть инкапсулированы в виросому. Поверхность виросомы так же, как и поверхность липосомы, может быть модифицирована различными низко- и высокомолекулярными соединениями [36].

Виромы — это сферические монослойные везикулы со средним диаметром 150 нм. Они представляют собой пустую оболочку вируса гриппа, лишенную нуклеокапсида, включая генетический материал самого вируса. В отличие от липосом виросомы содержат функциональные гликопротеины вирусной оболочки — гемагглютинин и нейраминидазу вируса гриппа, встроенные в фосфолипидный бислой. Характеристики виросом зависят от выбора компонентов бислоя. Они могут быть оптимизированы для максимального

включения препарата или достижения наилучшего физиологического эффекта путем изменения процентного содержания или типа липидов в мембране. В случае положительного заряда фосфолипидов виросомы также используются для доставки генетического материала. С целью обеспечения избирательной доставки поверхность виросом может быть модифицирована различными лигандами, такими как цитокины, пептиды, моноклональные антитела.

Уникальные свойства виросом частично связаны с присутствием в их мембране гемагглютинина вируса гриппа. Он способствует связыванию с клеткой-мишенью и рецептор-опосредованному эндоцитозу. Заключение в эндосому виросомальный гемагглютинин, активированный кислым значением рН среды, способствует слиянию мембран и высвобождению биологически активных соединений в цитоплазму клетки-мишени. Это делает виросомы перспективными транспортными системами для доставки биологически активных молекул [4; 36].

Известно, что виросомы были использованы в вакцинах для доставки белковых антигенов [4]. Виромы, к поверхности которых были присоединены Fab'-фрагменты моноклональных антител анти-HER-2/neu, использовались в противоопухолевой терапии [53].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Липосомальные системы доставки постоянно развиваются. Такие свойства липосом, как биосовместимость, защита включенных веществ от захвата клетками ретикулоэндотелиальной системы и метаболической деградации, возможность доставки гидрофобных и гидрофильных соединений к различным органам и тканям организма и, более того, способность доставлять эти соединения в цитоплазму клетки-мишени, делают их привлекательными для использования как в медицине, так и в научных исследованиях. Достижения молекулярной биологии, обеспечившие большой выбор лигандов, и углубление понимания молекулярных механизмов заболевания помогают определить подходящие мишени для направленной доставки липосом.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Abra R. M., Bankert R. B., Chen F. et al.* The next generation of liposome delivery systems: recent experience with tumor-targeted, sterically-stabilized immunoliposomes and active-loading gradients // *J. Liposome Res.* — 2002. — Vol. 12. — P. 1–3.
2. *Asai T., Shimizu K., Kondo M. et al.* Anti-neovascular therapy by liposomal DPP-CNDAC targeted to angiogenic vessels // *FEBS Lett.* — 2002. — Vol. 520. — P. 167–170.
3. *Blume G., Cevc G., Crommelin M. D. et al.* Specific targeting with poly(ethylene glucol)-modified liposomes: coupling of homing devices to the ends of polymeric chains combines effective target binding with long circulation times // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1993. — Vol. 1149. — P. 180–184.

4. *Bungener L., Idema J., Veer W. et al.* Virosomes in vaccine development: induction of cytotoxic T-lymphocytes activity with virosome-encapsulated protein antigens // *J. Liposome Res.* — 2002. — Vol. 12. — P. 155–163.
5. *Carrion C., de Madariaga M. A., Domingo J. C.* In vitro cytotoxic study of immunoliposomal doxorubicin targeted to human CD34+ leukemic cells // *Life Sciences.* — 2004. — Vol. 75. — P. 313–328.
6. *Corti A., Ponzoni M.* Tumor vascular targeting with Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and chemotherapeutic drugs // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2004. — Vol. 1028. — P. 104–112.
7. *Cryan S.* Carrier-based strategies for targeting protein and peptide drugs to the lungs // *The AAPS Journal.* — 2005. — Vol. 7, No. 1. — P. 20–41.
8. *Gabizon A., Shmeeda H., Horowitz A. T. et al.* Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates // *Advanced Drug Delivery Reviews.* — 2004. — Vol. 56. — P. 1177–1192.
9. *Gaspar M. M., Perez-Soler R., Cruz M. E.* Biological characterization of L-asparaginase liposomal formulations // *Cancer Chemother. Pharmacol.* — 1996. — Vol. 38. — P. 373–377.
10. *Goncalves A., Braud A. C., Viret F. et al.* Phase I study of pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx) in combination with carboplatin in patients with advanced solid tumors // *Anticancer Res.* — 2003. — Vol. 23, No. 4. — P. 3543–3548.
11. *Goren D., Horowitz A. T., Tzemach D. et al.* Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump // *Clinical Cancer Research.* — 2000. — Vol. 6. — P. 1949–1957.
12. *Hansen C. B., Kao G. Y., Moase E. H. et al.* Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1995. — Vol. 1239. — P. 133–144.
13. *Harrington K. J., Mohammadtaghi S., Uster P. S. et al.* Effective targeting of solid tumors in patients with locally advanced cancers by radiolabeled pegylated liposomes // *Clinical Cancer Research.* — 2001. — Vol. 7. — P. 243–254.
14. *Heeremans J. L., Prevost R., Bekkers M. E. et al.* Thrombolytic treatment with tissue-type plasminogen activator (t-PA) containing liposomes in rabbits: a comparison with free t-PA // *Thromb. Haemost.* — 1995. — Vol. 73. — P. 488–494.
15. *Hofland H. E., Masson C., Iginla S. et al.* Folate-targeted gene transfer in vivo // *Molec. Ther.* — 2002. — Vol. 5, No. 6. — P. 739–744.
16. *Huwyler J., Wu D., Padridge W. M.* Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1996. — Vol. 93. — P. 14164–14169.
17. *Ichikawa K., Hikita T., Maeda N. et al.* Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) by using long-circulating liposomes modified with peptide specific to angiogenic vessels // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2005. — Vol. 1669. — P. 69–74.
18. *Ishida O., Maruyama K., Okinaga K. et al.* Liposomes bearing polyethylene glucol-coupled transferring with intracellular targeting property to the solid tumors in vivo // *Pharm. Res.* — 2001. — Vol. 18. — P. 1042–1048.
19. *Janssen A. P., Schiffelers R.M., Hagen T. et al.* Peptide-targeted PEG-liposomes in anti-angiogenic therapy // *Int. J. Pharm.* — 2003. — Vol. 254. — P. 55–58.
20. *Kim A., Yun M. O., Oh Y. K. et al.* Phospholipid deformable vesicles for buccal delivery of insulin // *Chem. Phar. Bull. (Tokyo).* — 2002. — Vol. 50. — P. 749–751.
21. *Kisel M. A., Kulik L. N., Tsybovsky I. S. et al.* Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: studies in rat // *Int. J. Pharm.* — 2001. — Vol. 216. — P. 105–114.
22. *Klibanov A. L., Maruyama K., Torchilin V. P. et al.* Amphipatic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes // *FEBS Lett.* — 1990. — Vol. 268. — P. 235–238.
23. *Leamon C. P., Cooper S. R., Hardee G. E.* Folate-liposome-mediated antisense oligodeoxynucleotide targeting to cancer cells: evaluation in vitro and in vivo // *Bioconjug. Chem.* — 2003. — Vol. 14. — P. 738–747.
24. *Lestini B. J., Sagnella S. M., Xu Z. et al.* Surface modification of liposomes for selective cell targeting in cardiovascular drug delivery // *J. Control. Release.* — 2002. — Vol. 78. — P. 235–247.
25. *Li T., Hamdi J., Hawthorne F. M.* Unilamellar liposomes with enhanced boron content // *Bioconjug. Chem.* — 2006. — Vol. 17. — P. 15–20.
26. *Liu F., Huang L.* Development of non-viral vectors for systemic gene delivery // *J. Control. Release* — 2002. — Vol. 78. — P. 259–266.
27. *Lu Y., Low P. S.* Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents // *Advanced Drug Delivery Reviews.* — 2002. — Vol. 54. — P. 675–693.
28. *Lukyanov A. N., Elbayoumi T. A., Chakilam A. R. et al.* Tumor-targeted liposomes: doxorubicin-loaded long-circulating liposomes modified with anti-cancer antibody // *J. Control. Release.* — 2004. — Vol. 100. — P. 135–144.
29. *Lyass O., Hubert A., Gabizon A. A.* Phase I study of Doxil-Cisplatin combination chemotherapy in patients with advanced malignancies // *Clin. Cancer Res.* — 2001. — Vol. 7. — P. 3040–3046.
30. *Lyass O., Uziely B., Ben-Yosef R. et al.* Correlation of toxicity with pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) in metastatic breast carcinoma // *Cancer (Phila.).* — 2000. — Vol. 89. — P. 1037–1047.
31. *Maeda H.* The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting // — 2001. — Vol. 41. — P. 189–207.
32. *Mamot C., Drummond D. C., Greiser U. et al.* Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-targeted immunoliposomes mediate specific and efficient drug delivery to EGFR- and EGFRvIII-overexpressing tumor cells // *Cancer Res.* — 2003. — Vol. 63. — P. 3154–3161.
33. *Mastrobattista E., Crommelin D., Wilschut J. et al.* Targeted liposomes for delivery of protein-based drugs into

- the cytoplasm of tumor cells // *J. Liposome Res.* — 2002. — Vol. 12. — P. 57–65.
34. *Mastrobattista E., Kapell R. H. G., Eggenhuisen M.H. et al.* Lipid-coated polyplexes for targeted gene delivery to ovarian carcinoma cells E. In: Targeted liposomes for cytosolic drug delivery to tumor cells / Ed. by E. Mastrobattista — Enschede, Netherlands: FEBODRUK BV, 2001. — P. 168–192.
35. *Mastrobattista E., Koning G. A., Bloois L. et al.* Functional characterization of an endosome-disruptive peptide and its application in cytosolic delivery of immunoliposome-entrapped proteins // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277, No. 30. — P. 27135–27143.
36. *Mastrobattista E., Schoen P., Wilschut J.C. et al.* Targeting of influenza virosomes to ovarian carcinoma cells. In: Targeted liposomes for cytosolic drug delivery to tumor cells / Ed. by E. Mastrobattista — Enschede, Netherlands: FEBODRUK BV, 2001. — P. 102–120.
37. *Matsuura M., Yamazaki Y., Sugiyama M. et al.* Polycation liposome-mediated gene transfer in vivo // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2003. — Vol. 1612. — P. 136–143.
38. *Mercadal M., Domingo J. C., Petriz J. et al.* Preparation of immunoliposomes bearing poly(ethylene glycol)-coupled monoclonal antibody linked via a cleavable disulfide bond for ex vivo applications // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2000. — Vol. 1509. — P. 299–310.
39. *Metselaar J. M., Bruin P., de Boer L. W. et al.* A novel family of L-amino acid-based biodegradable polymer-lipid conjugates for the development of long-circulating liposomes with effective drug-targeting capacity // *Bioconjug. Chem.* — 2003. — Vol. 14. — P. 1156–1164.
40. *O'Shaughnessy J. A.* Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer // *Clin. Breast Cancer.* — 2003. — Vol. 4. — P. 318–328.
41. *Park J. W., Hong K., Kirpotin D. B. et al.* Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery // *Clin. Cancer Res.* — 2002. — Vol. 8. — P. 1172–1181.
42. *Pastorino F., Brignole C., Marimpietri D. et al.* Doxorubicin-loaded Fab'-fragments of anti-disialoganglioside immunoliposomes selectively inhibit the growth and dissemination of human neuroblastoma in nude mice // *Cancer Res.* — 2003. — Vol. 63. — P. 86–92.
43. *Sapra P., Allen T. M.* Internalizing antibodies are necessary for improved therapeutic efficacy of antibody-targeted liposomal drugs // *Cancer Res.* — 2002. — Vol. 62. — P. 7190–7194.
44. *Sapra P., Moase E. H., Ma J. et al.* Improved therapeutic responses in a xenograft model of human B lymphoma (Namalwa) for liposomal vincristine versus liposomal doxorubicin targeted via anti-CD19 IgG2a or Fab-fragments // *Clin. Cancer Res.* — 2004. — Vol. 10. — P. 1100–1111.
45. *Schiffelers R. M., Koning G. A., Hagen T. et al.* Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin // *J. Control. Release.* — 2003. — Vol. 91. — P. 115–122.
46. *Schiffelers R. M., Molema G., Hagen T.* Ligand-targeted liposomes directed against pathological vasculature // *J. Liposome Res.* — 2002. — Vol. 12. — P. 129–135.
47. *Schnyder A., Krahenbuhl S., Torok M. et al.* Targeting of skeletal muscle in vitro using bitinylated immunoliposomes // *Biochim. J.* — 2004. — Vol. 377. — P. 61–67.
48. *Schwonzen M., Kurbacher C. M., Mallmann P.* Liposomal doxorubicin and weekly paclitaxel in the treatment of metastatic breast cancer // *Anticancer Drugs.* — 2000. — Vol. 11. — P. 681–685.
49. *Skubitz K. M.* Phase II trial of pegylated-liposomal doxorubicin (Doxil) in sarcoma // *Cancer Invest.* — 2003. — Vol. 21, No. 2. — P. 167–176.
50. *Takeuchi H., Kojima H., Yamamoto H. et al.* Evaluation of circulation profiles of liposomes coated with hydrophilic polymers having different molecular weights in rats // *J. Control. Release.* — 2001. — Vol. 75. — P. 83–91.
51. *Torchilin V. P., Klibanov A. L., Huang L. et al.* Targeted accumulation of polyethylene glycol-coated immunoliposomes in infarcted rabbit myocardium // *FASEB J.* — 1992. — Vol. 6. — P. 2716–2719.
52. *Torchilin V. P., Levchenko T. S., Lukyanov A. N. et al.* p-Nitrophenylcarbonyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylcarbonyl groups // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2001. — Vol. 1511. — P. 397–411.
53. *Torchilin V. P., Levchenko T. S., Whiteman K. R. et al.* Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidones; synthesis, properties and liposome surface modification // *Biomater.* — 2001. — Vol. 22. — P. 3035–3044.
54. *Waelti E., Wegmann N., Schwaninger R. et al.* Targeting HER-2/neu with antirat neu virosomes for cancer therapy // *Cancer Res.* — 2002. — Vol. 62. — P. 437–444.
55. *Waterhouse J. E., Harbottle R. P., Keller M. et al.* Synthesis and application of integrin targeting lipopeptides in targeted gene delivery // *ChemBioChem.* — 2005. — Vol. 6. — P. 1212–1223.
56. *Whiteman K. R., Subr V., Ulbrich K. et al.* Poly(HPMA)-coated liposomes demonstrate prolonged circulation in mice // *J. Liposome Res.* — 2001. — Vol. 11. — P. 153–164.
57. *Wollina U., Dummer R., Brockmeyer N. H. et al.* Multicenter study of pegylated liposomal doxorubicin in patients with cutaneous T-cell lymphoma // *Cancer.* — 2003. — Vol. 98, No. 5. — P. 993–1001.
58. *Xu L., Tang W., Huang C. et al.* Systemic p53 gene therapy of cancer with immunolipoplexes targeted by anti-transferrin receptor scFv // *Molec. Med.* — 2001. — Vol. 7, No. 10. — P. 723–734.
59. *Yuan F., Leunig M., Huang S. K. et al.* Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft // *Cancer Res.* — 1994. — Vol. 54, No. 13. — P. 3352–3356.
60. *Zanten J., Doornbos-van der Meer B., Audouy S. et al.* A nonviral carrier for targeted gene delivery to tumor cells // *Cancer Gene Ther.* — 2004. — Vol. 11. — P. 156–164.

Поступила 30.01.2006.

УДК 615.45:577.115.083:616-006-092.4/9

*N. A. Oborotova<sup>1</sup>, A. A. Vilanskaia<sup>1</sup>, V.I. Procofeva<sup>1,2</sup>***THERMOSENSITIVE LIPOSOME DRUG FORMS IN THE  
EXPERIMENTAL ONCOLOGY**<sup>1</sup> *N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow*<sup>2</sup> *I. M. Sechenova Moscow Medical Academy***ABSTRACT**

In these review we have analyzed the advantages of liposome anticancer drug delivery and the main liposome types, used in the last few years. We observed the possibility of using thermosensitive liposome in combination with local hyperthermia and the mechanism of thermosensitive drug release from vesicles as well as the main characteristics of these liposomes. We have emphasized the role of space around the liposomes in drug release from thermoliposomes and their usefulness in suppressing multidrug resistance.

**Key words:** thermoliposomes, hyperthermia, trigger drug release, phase transition, multidrug resistance.

*Н. А. Оборотова<sup>1</sup>, А. А. Виланская<sup>1</sup>, В. И. Прокофьева<sup>2</sup>***ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ЛИПОСОМАЛЬНЫЕ  
ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ  
ОНКОЛОГИИ**<sup>1</sup> *ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*<sup>2</sup> *ММА им. И. М. Сеченова, Москва***РЕЗЮМЕ**

В обзоре проанализированы преимущества липосомальной доставки цитостатиков и основные виды липосомальных носителей, изучаемые в последние годы.

Описана возможность использования термочувствительных липосом для сочетанного применения с локальной гипертермией, а также механизм термозависимого высвобождения лекарственных веществ (ЛВ) из везикул и их основные характеристики. Указана роль среды в реализации термозависимого высвобождения ЛВ из термолипосом и применение последних в борьбе с множественной лекарственной устойчивостью опухолевых клеток.

**Ключевые слова:** термолипосомы, гипертермия, триггерное высвобождение, фазовый переход, множественная лекарственная устойчивость.

**ВВЕДЕНИЕ**

Повышение эффективности лекарственной терапии злокачественных новообразований проводится по разным направлениям. Кроме продолжения поиска новых избирательно действующих на опухоли лекарственных веществ (ЛВ) идет разработка рациональных лекарственных форм (ЛФ), позволяющих оптимизировать методики применения отобранных в эксперименте активных препаратов, создавать схемы и режимы полихимиотерапии, совершенствовать методы комплексного и комбинированного лечения злокачественных новообразований. Целенаправленное концентрирование ЛВ в опухолевой зоне с помощью ЛФ увеличивает селективность действия противоопухолевых препаратов и ограничивает их цитотоксическое действие на нормальные ткани.

В стремлении создать ЛФ для направленной доставки ЛВ исследователи идут различными путями. Одним из подходов к решению этой проблемы является микроинкапсулирование, т. е. использование специфических носителей — липосом, которые благодаря своим коллоидным свойствам, контролируемым размерам, поверхностным характеристикам, мембранотропности и биосовместимости рассматриваются как перспективные системы доставки ЛВ в кровяное русло.

**ЛИПОСОМАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ  
ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ  
ВЕЩЕСТВ**

За последние десятилетия для создания липосомальных препаратов испытывались ЛВ, относящиеся к следующим нозологическим группам: противовос-

палительные, противотуберкулезные, противопаразитарные, анестетики, ферменты, различные вакцины и гены. Однако наибольший интерес вызывают исследования в области совершенствования ЛФ противоопухолевых препаратов [1; 4; 5; 16; 18; 22; 35].

Известно, что сосудистая сеть здоровой ткани (кроме органов РЭС) имеет плотный непрерывный эндотелиальный слой, препятствующий проникновению в нее макромолекул и микровезикул. Опухолевая ткань в отличие от здоровой имеет ряд патофизиологических особенностей: гиперваскулярность, незаконченность сосудистой архитектоники, секреция факторов, увеличивающих проницаемость опухолевых сосудов, дренаж, создаваемый за счет макромолекул и частиц и обеспечивающий удержание липосом в опухолевой ткани [10; 15; 26]. В процессе развития опухолевого заболевания расстояние между эндотелиальными клетками, выстилающими внутреннюю поверхность капилляров в очагах поражения, может увеличиваться, и образующиеся поры позволяют малым однослойным липосомам (МОЛ) за счет пассивной конвективной диффузии проникать из кровотока в опухолевую ткань. Это обеспечивает более направленную доставку ЛВ в сравнении со свободным препаратом.

Возможность регуляции избирательного распределения липосом в организме путем изменения их состава делает липосомальную технологию предметом обширных научных изысканий с целью совершенствования химиотерапии злокачественных заболеваний. Особое значение имеет преимущественное высвобождение химиопрепаратов в опухолевых очагах и снижение его концентрации в здоровых тканях, а также продолжительность противоопухолевого воздействия вследствие более длительной циркуляции липосомальных препаратов в кровеносном русле. Показано, что липосомы, имеющие иной характер распределения в организме, нежели само ЛВ, существенным образом снижают токсичность и улучшают терапевтическую эффективность известных противоопухолевых препаратов, таких как доксорубин, даунорубин, метотрексат, цисплатин, блеомицин, митомицин и др. [4; 5; 18]. Некоторые из этих цитостатиков уже используются в химиотерапии в виде новых липосомальных ЛФ, другие находятся на стадиях доклинического и клинического исследований. Кроме того, в настоящее время изучается возможность применения липосомальных ЛФ для совершенствования основного направления фотохимиотерапии — метода фотодинамической терапии. Экспериментальные исследования липосомальных фотосенсибилизаторов показали возможность солюбилизации гидрофобных ЛВ, увеличение их биодоступности при внутривенном введении, поддержание высокого индекса селективности, обеспечивающего оптимальную фотодинамическую эффективность [2; 3].

Таким образом, к преимуществам использования липосомальных цитостатиков относятся следующие:

- улучшенная доставка ЛВ к месту опухоли;
- защита окружающих тканей от цитотоксического действия ЛВ;

- способность высвобождать ЛВ в ответ на действие экзогенного стимула;
- биологическая совместимость с системами организма;
- отсутствие кумулятивной токсичности;
- предупреждение местных тканевых реакций при введении цитостатиков;
- доступность технологических материалов и относительная простота изготовления липосом.

Липосомальные ЛФ можно вводить как внутривенно, так и внутримышечно, подкожно, внутрь различных полостей, ингаляционно, наружно, перорально. Однако, попадая в системный кровоток, липосомы быстро подвергаются опсонизации и последующему захвату фагоцитами РЭС. Это приводит к значительному снижению эффективности противоопухолевой терапии инкапсулированными препаратами. В результате длительных исследований показано, что подбором компонентов липидного бислоя липосом, их размера, заряда и поверхностных характеристик можно значительно увеличить стабильность везикул в биологических жидкостях, скорость высвобождения ЛВ из них и время циркуляции в кровяном русле [32; 36].

Обнаружение липосом, способных целенаправленно доставлять содержимое в солидные опухоли *in vivo*, связано с разработкой технологии активного включения в липосомы гамма-радиоактивного изотопа индия  $^{111}\text{In}$ . Успешное применение меченных  $^{111}\text{In}$  малых однослойных липосом для получения изображения ряда опухолей послужило стимулом к исследованию включения в них цитостатиков [54]. Благодаря определенным характеристикам распада  $^{111}\text{In}$ -изотоп стал прекрасным инструментом мониторинга липосомальных частиц *in vivo*. С помощью изотопного метода метки был исследован широкий спектр липосомных систем, различных по составу и физическим характеристикам.

Кроме того, большой раздел современных исследований посвящен разработке липосомального носителя, гарантирующего направленную доставку и контролируемое высвобождение инкапсулированного ЛВ в опухолевой ткани [1; 8]. С этой целью разрабатывается ряд специальных липосом, в т. ч.:

- иммунолипосомы, содержащие вектор в виде специфических моноклональных антител;
- катионные липосомы, содержащие в своем составе заряженный липид, тропный к эндотелию сосудов;
- рН-чувствительные липосомы, высвобождающие ЛВ в тканях с заниженным значением рН;
- термочувствительные липосомы, высвобождающие ЛВ в нагреваемых тканях.

Экспериментальные исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что использование липосомальных препаратов в комбинации с различными экзогенными физико-химическими стимулами (ультразвук или гипертермия) позволяет значительно увеличить селективность липосомальной доставки, контролировать скорость и место высвобождения ЛВ и в результате достигать его концентрирования в опухолевой ткани [29].

## ГИПЕРТЕРМИЯ В ПОВЫШЕНИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

С древних времен гипертермия (ГТ) рассматривалась в качестве вспомогательной терапии, способствующей повышению эффективности лечения ряда заболеваний, в т. ч. и опухолевых. В настоящее время ГТ широко исследуется как в экспериментальном, так и клиническом аспекте. Изучается проблема ее использования в сочетании с радиационным облучением и химиотерапией опухолей [11]. Клинически выделяют ГТ всего тела, региональную и локальную ГТ. Для создания ГТ используют электромагнитное поле, УЗ, перфузионные методы. Достижения клинической ГТ при лечении солидных опухолей (меланома, опухоли головы и шеи, молочной железы, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, глиобластома и саркома) представлены в ряде работ. Параллельно продолжают множественные доклинические исследования как *in vitro*, так и *in vivo* [20; 24; 27; 29; 38; 48; 49; 56; 57].

Обнаружено, что ГТ не только обладает самостоятельным цитотоксическим действием, но и увеличивает чувствительность опухолевых клеток к ряду цитостатиков; это явление назвали термохимиочувствительностью. При этом совместное применение ГТ и некоторых противоопухолевых агентов (митомидин, доксорубин) позволяет значительным образом усилить противоопухолевое влияние последних [17; 19]. Эффект, возникающий от сочетанного применения лекарственных препаратов и ГТ, классифицируют как:

- дополняющий, при котором наблюдается линейная зависимость цитотоксичности от повышения температуры;
- порогово-зависимый, при котором повышение температуры не вызывает или вызывает слабое увеличение цитотоксичности, но в момент пороговой температуры наблюдается резкое повышение цитотоксичности;
- независимый, когда повышение температуры не влияет на цитотоксичность.

При использовании большинства алкилирующих соединений типа циклофосфана, а также платиновых соединений в сочетании с нагревом в интервале 37–40,5 °С цитотоксичность повышается линейно. Цитотоксичность большинства антиметаболитов (5-фторурацил) так же, как и винко-алкалоидов и таксанов не изменяется при нагревании, в то время как антрациклин доксорубин имеет температурный порог [20].

Отмечено, что ГТ увеличивает проницаемость опухолевых сосудов для макромолекул (антител, ферритина, пигментов) [15; 43] и липосом [24; 29]. Обнаружено, что ГТ является причиной реоксигинации опухоли и что ее степень связана с достигаемым уровнем цитотоксичности [21]. Показано, что во время нагревания (43 °С) скорость кровяного потока в опухоли увеличивается в 1,5–2 раза по сравнению с ненагретым контрольным участком [46; 50]. В нормальных тканях ГТ также увеличивает кровоток, но не изменяет проницаемости обычных сосудов для липосом [10;

50–52]. Следовательно, за счет усиления локального кровотока и увеличения проницаемости сосудов опухоли ГТ может способствовать доставке липосом в пораженную область [14].

Однако ГТ не должна являться причиной повреждения тканей больного, поэтому необходимо подобрать такой состав липосом, который позволит высвободить ЛВ при температуре, не превышающей 43 °С. Для сочетанного применения липосом с локальной ГТ в последние годы изучаются термочувствительные липосомы. Преимущество этого направления в том, что выход ЛВ из липосом контролируется воздействием извне, что позволяет легко модифицировать желаемые условия нагрева пораженной области.

## ТЕРМОЛИПИДЫ ДЛЯ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ЛИПОСОМ

Для достижения оптимального терапевтического эффекта *in vivo* важное значение имеет длительное присутствие липосом в кровотоке и высвобождение содержимого липосом в опухолевой ткани. При этом кроме размера везикул важную роль играет липидная композиция бислоевой мембраны липосомы, которая должна быть термочувствительной и способной разрушаться при нагревании. Идея термочувствительных липосом заключается в их способности высвобождать ЛВ в ответ на действие локальной ГТ, в процессе которой опухоль нагревается до 41–45 °С. Известно, что ламеллярная структура липосомальной мембраны при переходе из геля в жидкокристаллическое состояние образует поры, через которые включенный цитостатик проникает в окружающую среду. Поэтому можно создать липосомы, которые будут высвобождать препарат преимущественно при температуре перехода липидов в жидкокристаллическую фазу [8; 24; 29; 33; 34]. Для создания термолипосом используются липиды, фазовый температурный переход которых находится в пределах 38–42 °С.

Однако термолипосомы должны удерживать в плазме заключенное в них ЛВ в течение определенного периода времени, высвобождая его только в ответ на экзогенный тепловой стимул (триггерное воздействие).

В 1978 г. М. В. Yatvin и соавт. предложили использовать для химиотерапии сочетание ГТ с технологическими возможностями липосом. Оригинальный состав термолипосом с неомицином, состоящий из нейтральных липидов дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC) и дистероилфосфатидилхолина (DSPC) в мольном соотношении как 7:1, был изучен *in vitro* на *E. coli* при различных температурах. В других работах ряд авторов использовали отрицательно заряженный дипальмитоилфосфатидилглицерол (DPPG). Эти липиды имеют низкие температуры плавления. Так, для DPPC и DPPG температура фазового перехода равна 41 °С, а для DSPC — 53 °С. При смешивании данных липидов можно создавать композиции с заданным значением температуры перехода в физиологически приемлемом интервале. В результате сочетанного применения ло-



кальной ГТ и липосомального носителя липидная мембрана разрушается, высвобождая препарат в окружающую среду.

Кроме вышеназванных термолипидов, определяющих термостабильность, важным компонентом бислойной мембраны является холестерин, который, взаимодействуя с гидрофобными концами фосфолипидов, обеспечивает их целостность, более плотную упаковку углеводородных цепей липидов и снижает температуру их фазового перехода [23; 28; 47]. В результате повышается стабильность липосомы в биологических жидкостях (при температуре 37 °С) и увеличивается термостабильность [12].

Проведенные *in vitro* исследования доказали, что липосомы с данной композицией липидов обладали способностью ГТ триггерно высвобождать включенный неомицин при температуре 42 °С [58; 59]. В дальнейшем появился ряд аналогичных исследований с другими препаратами, в основном — противоопухолевыми соединениями.

Роль липидной композиции и структуры липосом в исследованиях *in vitro* показана и на пустых липосомах. G. Arancia и соавт. (1994) обнаружили, что многослойные липосомы (МСЛ) способны сливаться с клеточными мембранами, изменяя их характеристики [6]. Проникая в клетку, липосомальная мембрана изменяет функции органелл. Этот эффект увеличивается в условиях ГТ. МОЛ не обладают такой токсичностью, поэтому важно отделять МСЛ от МОЛ в процессе приготовления липосомальной лекарственной формы.

### ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ЛИПОСОМ

Помимо температуры фазового перехода, другой функциональной характеристикой липосомальных липидов является дифференциальная термостабильность. Эта величина отражает разницу в высвобождении ЛВ из липосом при физиологической температуре (37 °С) и в условиях ГТ. Термостабильность показывает чувствительность липосом к ГТ, быстроту высвобождения ЛВ из них, а также их стабильность в биологических жидкостях в отсутствие нагрева (при 37 °С).

Для оценки рациональности липидной композиции и сочетанного применения липосомных препаратов с ГТ исследования проводятся в первую очередь *in vitro*. Большинство работ посвящено изучению интенсивности высвобождения ЛВ из термолипосом путем сравнения цитотоксичности различных липосомальных композиций и ГТ на культурах опухолевых клеток. В эксперименте *in vitro* был проведен сравнительный анализ нескольких липидных композиций липосом: DPPC/DSPC (7:1 или 6:3) и DPPC/DSPC/холестерин (6:3:2, 6:3:4 или 5:4:2) со средним диаметром везикул 50 нм, содержащих 6-карбоксивлюоресцеин. Термостабильность липосом определяли по высвобождению 6-карбоксивлюоресцеина. Их инкубировали при температуре 37 или 43 °С в фосфатном буфере с добавлением или без добавления бычьей сыворотки. В результате исследований было выявлено оптимальное соот-

ношение фосфолипид/холестерин (СН) 9:2, позволяющее эффективно стабилизировать липосомы в кровяном русле. Состав фосфолипидов и их соотношение в мембране липосом, согласно результатам исследований, отвечает за чувствительность липосом к воздействию ГТ и за скорость высвобождения препарата из них. Оптимально подобранная липосомальная композиция DPPC/DSPC/СН 5:4:2, характеризующаяся максимальной термостабильностью 70 % и температурой фазового перехода мембраны 41,2 °С, предлагается для дальнейших исследований *in vitro* и *in vivo* [37].

Исследования *in vitro* DPPC/DSPC/СН липосом в соотношении 5:4:2 с доксорубицином проводились J. L. Merlin (1991) на культуре клеток Hela S3 [37; 38]. В ходе эксперимента обнаружено, что:

1) инкапсулирование доксорубина в данных липосомах не ослабляет противоопухолевой активности препарата. При этом не найдено существенного различия в цитотоксичности свободного или включенного в липосомы доксорубина. Пустые липосомы не проявили цитотоксичности;

2) в комбинации с ГТ (43 °С) цитотоксичность доксорубина повышается, но не обнаружено значимого различия между свободным и липосомальным препаратом в дозе 0,1 и 0,2 мкмоль/л. Однако значительное увеличение цитотоксичности липосомального доксорубина (в 1,2 раза) наблюдается при использовании препарата в относительно малой дозе (0,05 мкмоль/л).

### ВЛИЯНИЕ ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ ВНУТРИ ЛИПОСОМЫ НА СКОРОСТЬ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЛВ

В экспериментах было показано, что на интенсивность высвобождения содержимого из везикул влияет разница осмотического давления, создаваемого макромолекулами ЛВ внутри липосомы и в окружающей их среде [13–55; Naoto Oki, 1994]. Чем осмотическое давление водной фазы липосом больше давления окружающей среды, тем быстрее происходит термозависимый (40–42 °С) разрыв липосомальной мембраны и выход содержимого в окружающую среду.

В эксперименте готовили липосомы, состоящие из DPPC, DSPC и дицетилфосфата (DCP) в молярном соотношении 9:1:1 с включенными ЛВ: состав с кальцином (натрия глюконат, содержащий флюорофор); состав с флюоресцеинизотиоцианатдекстраном (FD) различной молекулярной массы: FD-10сМг = 9400 и FD-150сМг = 144 000.

Установлено, что в момент фазового перехода термолипидов липосомальной мембраны высвобождение ЛВ протекало максимально интенсивно при осмотическом давлении внутри везикул 1,2 осМ (осмотическое давление фосфатного буфера = 0,3 осМ). Так, практически в 2 раза увеличилось высвобождение ЛВ из липосом с осмотическим давлением 0,6 осМ по сравнению с липосомами, у которых оно не превышало 0,3 осМ. Максимальный выход ЛВ зафиксирован для липосом с наибольшим осмотическим давлением — 1,2

osM в случаях как с кальцеином, так и с FD-10. Далее стабильность липосом с кальцеином проверяли в фосфатном буфере и в 50% бычьей сыворотке. Все составы липосом были устойчивы не менее 2 мес. при температуре 4 °С. Высвобождение кальцеина из липосом в сыворотке крови при температуре 37 °С увеличивалось во времени пропорционально их осмотическому давлению. Предполагается, что в момент перехода липидов липосомального бислоя из геля в жидкокристаллическое состояние высокое осмотическое давление внутри липосом обеспечивает направленный ток окружающего раствора внутрь липосом, липидная мембрана разрывается, высвобождая ЛВ, при этом концентрация макромолекул ЛВ в окружающей среде резко увеличивается. В эксперименте наиболее стабильными в условиях буфера и сыворотки при температуре 37 °С оказались липосомы с осмотическим давлением 0,6 osM. Уровень высвобождения препарата за 8 ч не превышал 10 % как в одном, так и в другом случае. Поэтому термочувствительные липосомы состава DPPC/DSPC/DCP (в соотношении 9:1:1) с осмотическим давлением внутренней водной фазы 0,6 osM предложены авторами работы для дальнейших исследований *in vivo*.

### ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КОМПОНЕНТОВ СЫВОРОТКИ НА ФУНКЦИИ ЛИПОСОМ, ТАКИЕ КАК ДОСТАВКА И ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ЛВ

Сыворотка крови содержит много протеинов, которые могут взаимодействовать с липосомами, изменяя их стабильность и термочувствительность. Scherphof и соавт. (1981) показали, что липопротеины крови способны разрушать липосомальную мембрану. В дальнейшем рядом авторов проводились исследования по изучению влияния компонентов сыворотки на функции липосом. В результате исследований *in vitro* было обнаружено, что высвобождение ЛВ из термолипосом шло более интенсивно в присутствии сыворотки по сравнению со стандартным буфером.

В эксперименте был проведен сравнительный анализ 2 типов липосом с митомицином С, состоящих из нейтрального DPPC-липида и сочетания этого липида с отрицательно заряженным (DPPG) в условиях буфера и плазмы при различной температуре. В присутствии плазмы при температуре 44 °С отмечалось 100%-е высвобождение ЛВ независимо от состава липосом, в то время как в буферной системе при той же температуре отмечалось высвобождение ЛВ лишь на 81 и 87 % соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о взаимодействии липосом с сывороточными белками и повышении высвобождения ЛВ при достижении температуры фазового перехода липосомальной мембраны.

Для выявления зависимости высвобождения митомицина С из липосом их инкубировали в течение 60 мин при температуре 37 и 42 °С в буферной системе и в присутствии плазмы. Оба состава липосом показали максимальное высвобождение ЛВ при температуре

42 °С в присутствии плазмы. Высвобождение ЛВ из нейтральных липосом достигло плато в значении 88 % при температуре 42 °С в буферном растворе и возросло до 99 % в присутствии плазмы. После смешивания анионных липосом (DPPC/DPPG) с плазмой при температуре 42 °С суммарный потенциал мембраны значительно вырос (с -46 до -31), а для нейтральных липосом практически не изменился. При этом последующее нагревание липосомальной дисперсии до температуры 42 °С в плазме никак не повлияло на мембранный потенциал обоих составов.

Ниже температуры фазового перехода мембранных липидов альбумин минимально связан с липосомальной мембраной, однако по мере приближения температуры к 42 °С количество связанного белка увеличивается и при достижении температуры фазового перехода липидов наблюдается максимальное значение этого показателя.

Основываясь на результатах вышеописанных исследований, а также на интерпретации кривых дифференциальной сканирующей калориметрии, авторы статьи предполагают, что при температуре ниже таковой фазового перехода липосомальных липидов белки плазмы связаны с анионными липосомами за счет электростатических взаимодействий между фосфолипидами и белковыми молекулами, в то время как нейтральные липосомы в очень малой степени способны взаимодействовать с белками плазмы. Благодаря присутствию плазменных белков, адсорбирующихся на липидной мембране за счет электростатических взаимодействий, липидный бислой становится стабильнее и препятствует случайному высвобождению ЛВ из липосом (DPPC/DPPG) при температуре ниже таковой фазового перехода липидов (высвобождение не более 15 %).

Однако для DPPC липосом в среде плазмы характерно увеличение высвобождения препарата при температуре ниже таковой фазового перехода липидов, что, возможно, обусловлено взаимодействием последних с протеинами плазмы, которые, по некоторым данным, способны вытягивать липиды из липосомального бислоя и таким образом дестабилизировать мембрану, способствуя преждевременному высвобождению ЛВ в кровотоки.

Когда же температура достигает таковой фазового перехода липосомальной мембраны, электростатические взаимодействия с белком подавляются. По данным кривых дифференциальной сканирующей калориметрии, пик, соответствующий значению фазового перехода липидной мембраны, расширяется и почти исчезает. Этот эффект может быть обусловлен уже другим механизмом — гидрофобными взаимодействиями между липидами мембраны и белками плазмы. Белок, связанный липидным бислоем, способен растягивать фосфолипидную структуру, дестабилизируя и изменяя липосомальную мембрану. Следовательно, гидрофобные взаимодействия протеинов с липидным бислоем индуцированы за счет фазового превращения липидов. Результаты, отражающие максимальное связывание альбумина с липосомами обоих составов при температуре

42 °С, поддерживают эту гипотезу. Таким образом, несмотря на то что оба состава липосом показали максимальное высвобождение ЛВ при температуре 42 °С в присутствии плазмы, наиболее рациональным составом термолипосом в данном эксперименте по критерию устойчивости в плазме при физиологической температуре выбран DPPC/DPPG [12; 13].

Доказано, что термочувствительность липосом, их стабильность в биологических жидкостях и продолжительность нахождения в кровотоке определяются составом компонентов липосомальной мембраны и их соотношением в бислое. Для проведения исследований *in vitro* по изучению механизма высвобождения доксорубицина в бычьей сыворотке и человеческой плазме авторы искали липосомальную композицию, способную длительное время оставаться в кровяном русле и противостоять захвату макрофагами РЭС, с максимальной термостабильностью и четким фазовым переходом липидов мембраны. В эксперименте использовали липосомы состава DPPC/HSPC/CHOL/PEG-PE в соотношениях 100:50:0:0, 100:50:75:0, 100:50:0:3, 100:50:30:6, 50:50:100:0 и 50:50:50:0. По данным кривых дифференциальной сканирующей калориметрии четкий фазовый переход наблюдался у липосом с соотношением холестерин/фосфолипид 5:1, у других композиций четкие пики, соответствующие переходу фосфолипидов мембраны, отсутствовали.

При исследованиях *in vitro* в фосфатном буфере у всех изучаемых типов липосом высвобождение препарата увеличивалось с повышением температуры, однако присутствие в составе некоторых композиций молекул холестерина значительно снижало уровень высвобождения препарата как при 37 °С, так и в условиях ГТ.

В среде бычьей сыворотки у липосом всех типов по сравнению с буфером наблюдалась одинаковая закономерность высвобождения ЛВ: с увеличением количества холестерина в липосомах усиливалось высвобождение препарата при температуре 37 °С, а с повышением температуры (до 45 °С) оно начинало снижаться. Как в среде бычьей сыворотки, так и в человеческой плазме минимальное высвобождение ЛВ при нормальных условиях и максимальное в условиях ГТ характерно для липосомальной композиции DPPC/HSPC/CHOL/PEG-PE в соотношении 100:50:30:6, в то время как у остальных липосом разница высвобождения в таких условиях была минимальной. Таким образом, данная композиция рекомендована для дальнейшего изучения *in vitro* и *in vivo*.

### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ В БОРЬБЕ С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ (МЛУ)**

В последнее время все большее внимание стали уделять проблеме, связанной с возникновением резистентности опухолевых клеток к ЛВ.

Среди механизмов, обеспечивающих возникновение резистентности, выделяют следующие:

— увеличение активности различных ферментативных систем в опухолевых клетках, таких как глутатион-S-трансфераза, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза, топоизомераза II или гексафосфатной метаболизм;

— избыточное образование трансмембранного белка гликопротеина, который работает по принципу помпы, обеспечивая активный выброс попавших в клетку ксенобиотиков, что может быть обусловлено избыточной экспрессией гена гликопротеина [5].

Этот белок присутствует почти во всех здоровых клетках органов человека (почки, печень, селезенка и др.) и отвечает за выброс биологически активных соединений.

Отмечена резистентность к следующим ЛВ: антрациклины, алкалоиды барвинка, эпиподофиллотоксин, дактиномицин, митоксантрон, таксол и их производные.

Существует множество препаратов, способных подавлять МЛУ, это такие, как верапамил, дилтиазем, гуанин, гуанидин, резерпин, тамоксифен, циклоспорин А. Однако для этого необходимы очень высокие дозы ЛВ, применение которых может привести к выраженному токсическому эффекту.

Одним из путей борьбы с лекарственной резистентностью является использование инкапсулированных форм ЛВ, обеспечивающих проникновение препарата внутрь резистентных клеток за счет слияния липосом с клеточной мембраной (минуя взаимодействие с гликопротеинами) [39]. В 1993 г. J. L. Merlin на модели аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 показал рациональность применения ГТ в сочетании с липосомальной композицией DPPC/DSPC/CH 5:4:2 для преодоления МЛУ [39]. В работе исследовалось действие термолипосом (DPPC/DSPC/CH = 5:4:2) и свободного доксорубицина на чувствительные и резистентные клетки аденокарциномы человека при температуре 37 и 43 °С. Резистентность (R) к свободному доксорубину в R-опухолевых клетках была в 200 раз выше, чем в чувствительных. При введении в чувствительные опухолевые клетки свободного и инкапсулированного препарата в дозе 0,15 и 0,35 мкмоль/л при температуре 37 °С в обоих случаях цитотоксичность была приблизительно одинакова, пропорциональна дозе 48 и 22 % выживших клеток для свободного ЛВ и 52 и 24 % — для липосомального. В условиях локальной ГТ (43 °С) произошло усиление эффекта как свободного ЛВ (10 и 1 %), так и липосомального доксорубицина (9 и 1 %) в 5 раз. Это может быть связано прежде всего с тем, что опухолевые клетки изолированы от воздействия окружающей среды и ЛВ оказывает на них, таким образом, непосредственное влияние [39].

Изучая *in vitro* характер внутриклеточного накопления даунорубицина в Р-гликопротеинэкспрессирующей линии клеток при действии термолипосом в сочетании с ГТ, J. L. Merlin и соавт. (1995) обнаружили также значительное увеличение захвата липосомального препарата клетками MCF-7 [40].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, можно отметить, что рациональность использования липосомальных лекарственных форм в настоящее время доказана на ряде противоопухолевых препаратов. Возможность регуляции избирательности распределения липосом в организме является актуальной задачей и активно изучается в целях разработки терапевтических препаратов для режимов как обычной химиотерапии, так и для фотодинамической терапии. В настоящее время наибольший интерес представляют исследования в области использования липосомальных препаратов в комбинации с УЗ- и ГТ-воздействием, что позволяет увеличить селективность доставки ЛВ к опухоли.

Для сочетанного применения липосом с локальной гипертермией изучаются термочувствительные липосомы, когда выход ЛВ в опухоли контролируется с помощью нагрева пораженной области. Для создания термолипосом используются липиды, фазовый температурный переход которых находится в пределах 38–42 °С. Работы проводятся *in vitro* и *in vivo* по подбору рациональных композиций термолипосом, оценивается дифференциальная термостабильность липосом, скорость высвобождения лекарств и соответствующий цитотоксический эффект. На интенсивность высвобождения лекарств из липосом влияет разность осмотического давления, создаваемая внутри липосом и в окружающей их среде. Чем выше осмотическое давление внутри липосом, тем быстрее ГТ вызывает разрыв липосомальной мембраны и высвобождает ЛВ в пораженную зону. Предложена липосомальная композиция DPPC/HSPC/CH в соотношении 100:50:30:6, для которой минимальное высвобождение ЛВ в среду бычьей сыворотки или человеческой плазмы наблюдается при температуре 37 °С, а максимальное — в условиях ГТ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Барышников А. Ю., Оборотова Н. А. Иммунолипосомы — новые средства доставки лекарственных препаратов // Совр. онкол. — 2001. — Т. 3, № 2. — С. 44–46.
2. Меерович И. Г., Оборотова Н. А. Применение липосом в фотохимиотерапии: 1. Липосомы в ФДТ // Рос. биотер. журн. — Т. 2, № 4. — С. 3–8.
3. Меерович И. Г., Смирнова З. С., Лукьянец Е. А. Фенилтиозамещенные фталоцианины — новые фотосенсибилизаторы ближнего инфракрасного диапазона // Рос. биотер. журн. — 2004. — Т. 3, № 1. — С. 54–60.
4. Оборотова Н. А. Липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов // Хим.-фармацевт. журн. — 2001. — Т. 34, № 4. — С. 32–38.
5. Оборотова Н. А., Барышников А. Ю. Липосомальные лекарственные формы в клинической онкологии // Успехи современ. онкол. — 2001. — Т. 121, № 5. — С. 464–475.
6. Arancia G., Calcabrini A., Matarrese P. et al. Effect of incubation with liposomes at different temperature on cultured melanoma cells (M14) // Int. J. Hyperthermia. — 1994. — Vol. 10. — P. 101–114.
7. Chelvi T. P., Ralhan R. Designing of termosensitive liposomes from natural lipids for multimodality cancer therapy // Int. J. Hyperthermia. — 1995. — Vol. 11. — P. 685–695.
8. Dass C. R., Walker T. L., Burton M. A., Decruz E. E. Enhanced anticancer therapy mediated by specialized liposomes // J. Pharmac. Pharmacol. — 1997. — Vol. 49. — P. 972–975.
9. Dewhirst M. W., Proznitz L., Thrall D. et al. Hyperthermic treatment of malignant diseases: Current status and a View toward the Future // Seminars in Oncology. — 1977. — Vol. 24, No. 6. — P. 616–625.
10. Durar T., Jain R. Differential response of normal and tumor microcirculation of hyperthermia // Cancer Res. — 1984. — Vol. 44. — P. 605–612.
11. Falk M. N., Issels R. D. Hyperthermia in oncology // Int. J. Hyperthermia. — 2001. — Vol. 17, No. 1. — P. 1–18.
12. Gaber M.H. Effect of bovine serum on the phase transition temperature of cholesterol-containing liposomes // J. Microencaps. — 1998. — Vol. 15. — P. 207–214.
13. Gaber M. H., Hong K., Huang S. K., Wu N. Z., Papahadjopoulos. Termosensitive sterically stabilized liposomes: formulation and in vitro studies of mechanism of doxorubicin release by bovin serum and human plasma // Pharmac. Res. — 1995. — Vol. 12. — P. 1407–1416.
14. Gaber M. H., Hong K., Wu N. Z. et al. Termosensitive liposomes: extravasation and release of contents in tumor microvascular // Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys. — 1996. — Vol. 36, No. 5. — P. 1177–1187.
15. Gerlowsky L., Jain R. Effect of hyperthermia on microvascular permeability to macromolecules in normal and tumor tissues // Int. J. Microcirc. Clin. Experiment. — 1985. — Vol. 4. — P. 363–372.
16. Green S., Fortier A., Dukstra J. et al. Liposomal vaccines // Advances in Experiment. Med. Biol. — Vol. 383. — P. 83–92.
17. Hahn G.M., Braun J., Har-Kedar I. Thermochemotherapy: synergism between hyperthermia and adriamycin in mammalian cell inactivation / Proceeding of the Natural Academy of Science of the United States of America. — Vol. 72. — P. 937–940.
18. Harrington K. J., Lewanski C. R., Stewart J. S. W. Liposomes as Vehicles for Targeted Therapy of Cancer. Part 2: Clinical Development // Clin. Oncol. — 2000. — Vol. 12. — P. 16–24.
19. Herman T. S. Temperature dependence of adriamycin, cis-diamminedichloroplatinum, bleomycin, and 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea cytotoxicity in vitro // Cancer Res. — Vol. 43. — P. 517–520.
20. Hildebrandt B., Wust P., Ahlers O. et al. The cellular and molecular basis of hyperthermia // Crit. Rev. Oncol. Hematol. — 2002. — Vol. 43. — P. 33–56.
21. Horsman M. R., Overgaard J. Can mild hyperthermia improve tumor oxygenation? // Int. J. Hyperthermia. — Vol. 13. — P. 141–147.

22. Hosokawa T., Sami M., Kato Y., Hayakawa E. Alteration in the temperature — dependent content release property of thermosensitive liposomes in plasma // *Chem. Pharm. Bull.* — 2003. — Vol. 51, No. 1. — P. 1227–1237.
23. Ickenstein M. L., Arfvidsson C. M., Needham D. Disk formation in cholesterol-free liposomes during phase transition // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2003. — Vol. 1614. — P. 135–138.
24. Iga K., Hamaguchi N., Igari Y. *et al.* Heat-specific drug release of large unilamellar vesicle as hyperthermia-mediated targeted delivery // *Int. J. Pharmac.* — 1989. — Vol. 57, No. 3. — P. 241–251.
25. Iga K., Ogawa Y., Toguchi H. Heat induced drug release rate and maximal targeting index of thermosensitive liposomes in tumor bearing mice // *Pharmac. Res.* — 1992. — Vol. 9, No. 5. — P. 658–662.
26. Jain R. K. Transport of molecules across tumor vasculature // *Cancer Metast. Rev.* — 1987. — Vol. 6. — P. 559–593.
27. Kakinuma K., Tanaka R., Takahashi H. *et al.* Targeting chemotherapy for malignant brain tumor using thermosensitive liposome and localized hyperthermia // *J. Neurosurg.* — 1988. — Vol. 84. — P. 180–184.
28. Kirby C., Clarke J., Gregoriadis G. Effect of cholesterol content of small unilamellar vesicles on the stability in vivo and in vitro // *Biochem. J.* — 1980. — Vol. 186. — P. 591–598.
29. Kong G., Dewhirst M. Hyperthermia and liposomes // *Int. J. Hyperthermia.* — 1999. — Vol. 15. — P. 345–370.
30. Lee A.G. Lipid phase transition and phase diagrams. Lipid phase transition // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1977. — Vol. 472. — P. 237–281.
31. Litzinger D., Huang L. Phosphotidylethanolamine liposomes: drug delivery, gene transfer, and immunodiagnostic applications // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1992. — Vol. 113. — P. 201–227.
32. Litzinger D., Buiting A. M. J., van Rooijen N., Huang L. Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution and amphipathic polyethylene glycol-containing liposomes // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1994. — Vol. 1190. — P. 99–107.
33. Magin R. L., Niesman M. R. Temperature-dependent drug release from large unilamellar liposomes // *Cancer Drug Delivery.* — 1984. — Vol. 1. — P. 109–117.
34. Magin R. L., Niesman M. R. Temperature-dependent permeability of large unilamellar liposomes // *Chem. Phys. Lipids.* — 1984. — Vol. 34. — P. 245–256.
35. Massing U. Cancer therapy with liposomal formulations of cancer drugs // *Int. J. Clin. Pharm. Ther.* — 1997. — Vol. 35. — P. 87–90.
36. Majer L. D., Tai L., Ko D. *et al.* Influence of vesicle size, lipid composition, and drug-to-lipid ratio on the biological activity of liposomal doxorubicin in mice // *Cancer Res.* — 1989. — Vol. 49. — P. 5922–5930.
37. Merlin J. L. Encapsulation of doxorubicin in thermosensitive small unilamellar vesicle liposomes // *Eur. J. Cancer.* — 1991. — Vol. 27. — P. 1026–1030.
38. Merlin J. L. In vitro evaluation of the association of thermosensitive liposome — encapsulated doxorubicin with hyperthermia // *Eur. J. Cancer.* — 1991. — Vol. 27. — P. 1031–1034.
39. Merlin J. L., Marchal S., Ramacci C. *et al.* Antiproliferative activity of thermosensitive liposome-encapsulated doxorubicin combined with 43 degrees C hyperthermia in sensitive and multidrug — resistant MCF-7 cells // *Eur. J. Cancer.* — 1993. — Vol. 29A. — P. 2264–2268.
40. Merlin J. L., Marchal S., Ramacci C. *et al.* Modulation of daunorubicin intracellular accumulation in P-glycoprotein expressing MCF-7 human breast adenocarcinoma cells by thermosensitive — liposome encapsulation and hyperthermia // *Int. J. Hyperthermia.* — 1995. — Vol. 11. — P. 855–865.
41. Muggia F. Clinical efficacy and prospects for use of pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of ovarian and breast cancers // *Drugs.* — 1997. — Vol. 54. — P. 22–29.
42. Ning S., Macleod K., Abra R. M., Huan A.H. Hyperthermia induces doxorubicin release from long-circulating liposomes and enhances their antitumor efficacy // *Int. J. Rad. Oncol., Biol., Phys.* — 1994. — Vol. 29. — P. 827–834.
43. Oku Noato, Naruse Ryoko, Doi Kanak, Okada Shoji. Potential usage of thermosensitive liposomes for macromolecular delivery // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1994. — Vol. 119. — P. 389–391.
44. Ono A., Horikoshi I., Ueno M. Study on hepatic artery chemoembolization using temperature-sensitive liposome or lipiodol emulsion // *Biol. Pharm. Bull.* — 1995. — Vol. 18(2). — P. 279–283.
45. Papahadjopoulos D., Jacobson K., Nir S. Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1973. — Vol. 311. — P. 330–348.
46. Pence D., Song C. Effects of heat on blood flow. Hyperthermia in cancer — treatment / Ed. by L. Anghileri, J. Robert. — Boca Raton, FL: CRC Press, 1986. — P. 1–16.
47. Senior J., Gregoriadis G. Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation. The effect of the phospholipids and cholesterol content // *Life Sci.* — 1982. — Vol. 30. — P. 2123–2136.
48. Shinkai M., Suzuki M., Iijima S., Kobayashi T. Antibody-conjugated magnetoliposomes for targeting cancer cells and their application in hyperthermia // *Biotech. Applied Biochem.* — 1995. — Vol. 21. — P. 125–137.
49. Shinkai M., Yanase M., Honda H. *et al.* Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: in vitro study // *Japan. J. Cancer Res.* — 1996. — Vol. 87. — P. 1179–1183.
50. Song C. Effects of local hyperthermia on blood flow and microenvironment: a review // *Cancer Res.* — 1984. — Vol. 44. — P. 4721–4730.
51. Song C., Kang M. S., Rhee J. G., Levir S. H. Effect of hyperthermia on vascular function in normal and

neoplastic tissues // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1980. — Vol. 335. — P. 35–43.

52. *Song C., Lokshina A., Rhee J. G., Patten M., Levitt S. H.* Implication of blood flow in hyperthermic treatment of tumors // *IEEE Transact. Biomed. Engin.* — 1984. — Vol. 31. — P. 9–16.

53. *Tomita T., Watanabe M., Takahashi T. et al.* Temperature-sensitive release of adriamycin, an amphiphilic antitumor agent, from dipalmitoylphosphatidylcholine — cholesterol liposomes // *Biochem. Biophys. Acta.* — 1989. — Vol. 978. — P. 185–190.

54. *Torchilin V. P.* Liposomes as delivery agents for medical imaging // *Molec. Med. Today.* — 1996. — Vol. 2. — P. 242.

55. *Unzaki S., Maruyama K., Takahashi N. et al.* Enhanced delivery and antitumor activity of doxorubicin using long-circulating thermosensitive liposomes containing amphipathic polyethyleneglycol in combination with local hyperthermia // *Pharmac. Res.* — 1994. — Vol. 11. — P. 1180–1185.

56. *Yanase M., Shinkai M., Honda H. et al.* Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: ex vivo study // *Japan. J. Cancer Res.* — 1997. — Vol. 88. — P. 630–632.

57. *Yanase M., Shinkai M., Honda H. et al.* Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite

cationic Liposomes: an in vivo study // *Japan. J. Cancer Res.* — 1998. — Vol. 89. — P. 463–469.

58. *Yatvin M. B., Weinstein J. N., Dennis W. H., Blumenthal R.* Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia // *Science.* — 1978. — Vol. 202. — P. 1290–1293.

59. *Yatvin M. B., Muhlensiepen H., Porschen W. et al.* Selective delivery of liposome-associated cis-dichlorodiamineplatinum(II) by heat and its influence on tumor drug uptake and growth // *Cancer Res.* — 1981. — Vol. 41. — P. 1602–1607.

60. *Yuyama Y., Tsujimoto M., Fujimoto Y., Oku N.* Potential usage of thermosensitive liposomes for site-specific delivery of cytokines // *Cancer Lett.* — 2000. — Vol. 155. — P. 71–77.

61. *Yuan F., Dellian M., Fukumura D. et al.* Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cut off size // *Cancer Res.* — 1995. — Vol. 55. — P. 3752–3756.

62. *Zhao Y., Cao Y., Yuan F. et al.* Differential sensitivity of several tumor lines to a doxorubicin containing low temperature sensitive liposomes: microenvironmental effects / *Symposium: Strategies for Targeted Therapeutic Delivery, 2000.* — P. 123–124.

Поступила 05.10.05

УДК 618.11+618.14]-006.6-033.2:577.21

*Yu. G. Payanidi, V. Yu. Selchuk, A. Yu. Asanov, K. I. Gordania, T. I. Zakharova*

## THE ROLE OF GENETIC MARKERS IN DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF ENDOMETRIOID OVARIAN CANCER AND CORPUS UTERUS CANCER

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

### ABSTRACT

The multiple primary malignancies are not yet studied well enough at present. The female genital polyneoplasia is, probably, the most urgent problem in clinical oncology. The differential diagnosis of multiple primary malignancies is the most important question to solve. Sometimes, it is very difficult to differentiate metastasis from multiple primary malignancies. The complex diagnosis methods including clinical laboratory instrumental and genetic will account for final diagnosis of this type of cancer.

**Key words:** endometrioid adenocarcinoma, ovarian, corpus uterus, metastasis.

*Ю. Г. Паяниди, В. Ю. Сельчук, А. Ю. Асанов, К. И. Жордания, Т. И. Захарова*

## РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ СИНХРОННОГО ЭНДОМЕТРИОИДНОГО РАКА ЯИЧНИКОВ И ТЕЛА МАТКИ

*ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*

### РЕЗЮМЕ

Первично-множественные опухоли относятся к одной из наименее изученных проблем в современной онкологии. Существенное место в их структуре занимают полинеоплазии органов женского генитального тракта. Особенно актуальна дифференциальная диагностика первично-множественных и метастатических опухолей. Сказать, в каких случаях имеется первичная множественность, а в каких — метастазы, порой бывает очень сложно. Окончательно диагноз может быть установлен только путем комплексного обследования больного с использованием различных диагностических методик: клинических, лабораторных, инструментальных, а в последние годы и молекулярно-генетических методов исследования.

**Ключевые слова:** эндометриоидная аденокарцинома, яичники, тело матки, метастаз.

### ВВЕДЕНИЕ

За последнее десятилетие в онкологии возрос интерес к изучению проблем, связанных с феноменом первичной множественности опухолей. Это обусловлено, в первую очередь, повсеместным увеличением количества больных данным видом онкологической патологии. Не последнее место в проблематике занимает возможность постановки и решения академических проблем канцерогенеза с использованием моделей первично-множественных и метастатических злокачественных новообразований. Предметом оживленных обсуждений и дискуссий является вопрос о дифференциальной диагностике синхронных злокачественных опухолей тела матки и яичников. Вместе с тем по ре-

зультатам немногочисленных публикаций, в которых, как правило, приведены единичные клинические наблюдения, не представляется возможным сделать вывод, в каких случаях процесс следует трактовать как первично-множественный, а в каких — как метастатический. Не будет преувеличением сказать, что этот вопрос встает особенно остро при выборе соответствующей тактики лечения таких больных. Зачастую на практике большинство клиницистов склонны рассматривать синхронные злокачественные новообразования тела матки и яичников как метастатические, представляющие собой единый распространенный опухолевый процесс [1]. Между тем это не всегда бывает оправдано. Для выяснения некоторых аспектов проблемы нами было проведено комплексное исследование синхрон-

ных первично-множественных и метастатических злокачественных новообразований яичников и тела матки.

**Цель исследования** — оценка эффективности использования молекулярно-генетических технологий для анализа клонального происхождения множественных опухолей репродуктивной системы женского организма. Теоретическая основа работы — фундаментальное представление о моноклональной природе опухолей.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для изучения гистотипа и клинических особенностей синхронных опухолей были использованы данные 79 случаев, наблюдавшихся в клинике с 1990 по 2004 г. Показано, что большинство синхронных опухолей тела матки и яичников имеет строение эндометриоидной аденокарциномы. У 41 (52 %) больной морфологически был подтвержден диагноз рака тела матки с метастазами в яичниках, а в 38 (48 %) случаях после планового гистологического исследования был поставлен диагноз первично-множественного синхронного рака яичников и рака тела матки. Для проведения молекулярно-генетических исследований был получен материал от 8 женщин, у которых диагностирован синхронный эндометриоидный рак яичников и матки (эндометрия). На основании результатов клинико-патологического и гистологического исследований каждый случай был оценен либо как случай первичной опухоли с метастазированием, либо как синхронный первично-множественный рак. Образцы тканей были подвергнуты препаративной микродиссекции с выделением пораженной и интактной областей, из которых в последующем были выделены уникальные образцы ДНК.

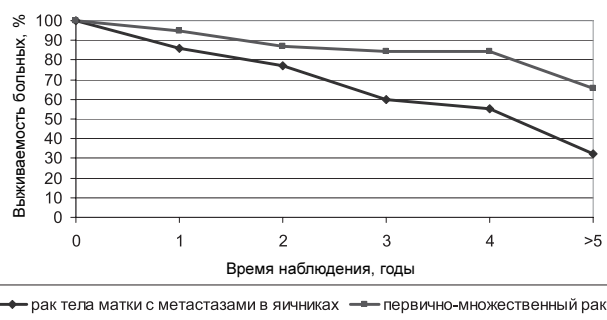
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали наши исследования, клиническое течение заболеваний в 2 группах больных (раком тела с метастазами в яичниках и синхронным первично-множественным раком тела матки и раком яичников) имеет ряд существенных статистически достоверных отличий. Метастазы в яичниках при раке тела матки чаще всего выявляются у более пожилых женщин в менопаузе. В большинстве случаев у них наблюдается местнораспространенный опухолевый процесс, при котором опухоль эндометрия, представленная аденокарциномой с плоскоклеточной метаплазией (36,5 %), имеет смешанную форму роста (51,2 %), занимает всю полость матки и переходит на цервикальный канал (53,7 %), ее размеры превышают 5 см (48,8 %), а глубина инвазии в миометрий составляет более 1 см (56,1 %).

У больных первично-множественным синхронным раком тела матки и раком яичников заболевания выявляются чаще в молодом возрасте при сохраненной менструальной функции (57,9 %). В этих случаях чаще всего наблюдается высокодифференцированная аденокарцинома тела матки (52,6 %) с экзофитной формой роста (71,1 %), ее размер редко достигает 5 см (10,5 %), глубина инвазии миометрия не превышает

0,5 см (78,95 %). Опухоль эндометрия в редких наблюдениях (10,5 %) переходила на цервикальный канал, причем при глубине инвазии не более 1 см.

Сравнительное сопоставление выживаемости при синхронном первично-множественном раке яичников и раке эндометрия и выживаемости больных раком тела матки с метастазами в яичниках показывает, что для 1-й группы больных характерно более благоприятное течение заболевания. У них реже развиваются рецидивы — в 12 (31,6 %) наблюдениях, а 5-летняя выживаемость достигает 66,2 % (рис. 1).



**Рис. 1.** Выживаемость 2 групп больных (первично-множественным синхронным раком яичников и раком эндометрия и раком тела матки с метастазами в яичниках)

Уровень общей 5-летней выживаемости больных раком тела матки с метастазами в яичниках составил 32,2 %. Срок, к которому погибло 50 % больных, —  $39,3 \pm 3,2$  мес. Различия в группах сравнения статистически достоверны ( $p < 0,05$ ).

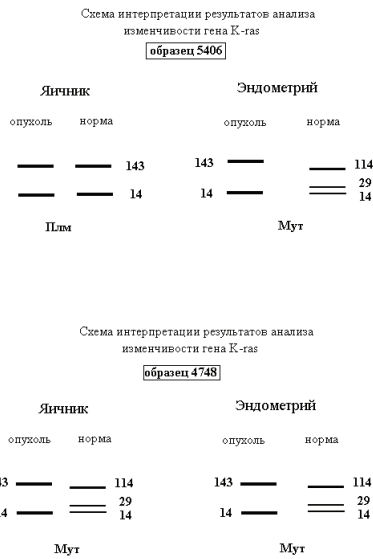
На 2-м этапе работы были предприняты молекулярно-генетические подходы к дифференциальной диагностике синхронных полинеоплазий яичников и тела матки. Для этого были проведены исследования молекулярно-генетического разнообразия в опухолевых и нормальных тканях изучаемых органов путем анализа мутаций гена *K-ras* и феномена потери гетерозиготности (ЛОН-анализ).

**Анализ мутаций гена *K-ras*.** Одним из наиболее изученных онкогенов, активация которого часто обнаруживается при раке яичников, является ген *K-ras*. Продукт гена *K-ras* относится к классу G-белков и участвует в самых разнообразных аспектах регуляции клеточных процессов. Ранее было показано, что характер мутаций в гене *K-ras* зависит от гистологического типа и локализации опухоли. Так, мутации *K-ras* значительно чаще регистрируются при муцинозных по сравнению с немучинозным раком яичников, что позволяет обсуждать перспективность исследований мутаций гена *K-ras* для дифференциальной диагностики.

При рестрикции ПЦР продукта (157 п. н.) в случае отсутствия мутации имеется 2 сайта для эндонуклеазы, что приводит к образованию 3 фрагментов (114, 29 и 14 п. н.). При наличии мутации вследствие исчезновения одного из сайтов рестрикции образуются фраг-



менты 143 и 14 п. н. Схемы-интерпретации результатов анализа изменчивости гена K-ras представлены на рис. 2.

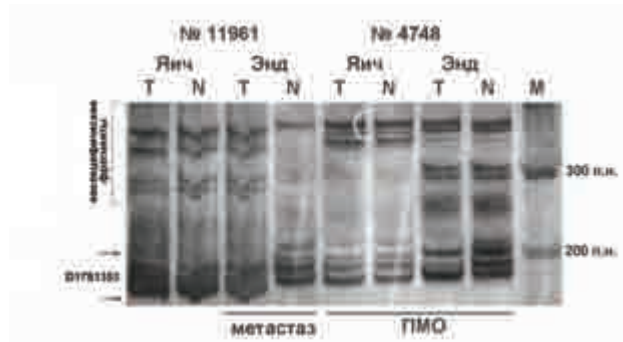


**Рис. 2.** Изменчивость гена K-ras: Мут — мутация; Плм — полиморфизм

Анализ потери гетерозиготности (LOH-анализ) был выполнен с использованием полиморфных микросателлитных маркеров для аллелей D3S4614 (3p21.31), D3S4604 (3p21.31–p21.2) гена RASSF1A и аллелей D17S578 (17p13) и D17S1353 (17p13) гена p53. Для LOH-анализа сравнивали интенсивность аллелей высокой (H-аллели) и низкой (L-аллели) молекулярной массы в соответствующих парах опухоль—норма. Случаи с уменьшением интенсивности одного из аллелей на 50 % и более рассматривали как LOH.

На следующем этапе работы была предпринята попытка выяснения, являются ли случаи множественных опухолей полинеоплазиями или же имеют метастатическое происхождение. Хорошо доказан факт, что каждая ткань характеризуется своим, как правило уникальным, набором микросателлитных локусов разной длины. Этот феномен был использован в настоящей работе для анализа происхождения опухолей. Если опухоли возникли независимо друг от друга, то картина расположения микросателлитных полос у них не будет соответствовать друг другу, если же 2-я опухоль — метастаз, то будет наблюдаться соответствие микросателлитов. В результате сопоставительного анализа аллельного дисбаланса в опухолевых и нормальных тканях исследованных органов было сделано заключение о природе множественности поражения в каждом из 7 случаев. Логику заключения демонстрирует следующий пример (рис. 3).

Примером иллюстрации трактовки происхождения первично-множественности являются образцы опухолей яичника и эндометрия больной № 4748. Из рис. 3 ясно, что характеристики опухоли яичника и нормальной ткани яичника совпадают как по локусу



**Рис. 3.** Картина электрофоретического разделения продуктов ПЦР образцов тканей яичника и эндометрия больных № 11961 и № 4748 по локусу D17S1353

D17S1353, так и по набору («лестнице») неспецифических фрагментов. Вместе с тем особенности неспецифических фрагментов опухоли эндометрия и нормальной ткани эндометрия полностью совпадают, а «лестницы» опухоли эндометрия и яичника существенно различаются. Таким образом, опухоли яичника и эндометрия не совпадают по набору неспецифических фрагментов ДНК, но идентичны соответствующим нормам, т. е. тканям, из которых они сформировались (табл. 1).

Таблица 1.

**Результаты сопоставительного сравнения аллельного дисбаланса в опухолевых и нормальных тканях исследованных органов и результаты гистологического исследования**

Маркер		5406	8356	5641	11961	4748	5342	7253
RASSF1A	D3S4614	Мет	Мет	Мет	Мет	ПМО	ПМО	Мет
	D3S4604	Мет	ПМО	Мет	ПМО	ПМО	ПМО	Мет
p53	D17S578	Мет	Мет	Мет	Мет	ПМО	ПМО	ПМО
	D17S1353	Мет	Мет	Мет	Мет	ПМО	ПМО	Мет
Обобщенный результат		Мет	Мет	Мет	Мет	ПМО	ПМО	Мет

Примечание: Мет — метастаз; ПМО — первично-множественные опухоли.

В целом сравнение полученных результатов с результатами гистологических исследований показало, что в 3 случаях отмечается полное или почти полное совпадение результатов молекулярно-генетического анализа 6 полиморфных локусов и заключения гистологов. В других 3 случаях выводы молекулярных и гистологических исследований не совпадали (см. табл. 1).

Для уточнения результатов молекулярно-генетического исследования несовпадающих случаев были предприняты дополнительные исследования 6 других полиморфных локусов гена RASSF1 (D3S2405, D3S2409, D3S3047, D3S2454, D3S2456 и D3S1766). Кроме того, в качестве контроля дополнительно иссле-

довано 2 случая с полным соответствием ранее полученных результатов (№ 4748 и 5342). Результаты дополнительных исследований приведены в табл. 2 и 3.

Таблица 2.

**Результаты дополнительного исследования молекулярно-генетического разнообразия в опухолевых и нормальных тканях исследованных органов**

Маркер	Локализация	5406		5641		11961		4748		5342	
		Яич	Энд	Яич	Энд	Яич	Энд	Яич	Энд	Яич	Энд
D3S2405	Зр25.3	ni	ni	Да	ni	ni	ni	Д	ni	ni	ni
D3S3047	Зр22.3	ni	ni	ni	О	Д	ni	ni	ni	О	О
D3S2409	Зр21.31	О	ni	О	ni	Д	Да	MI	MI	О	О
D3S2456	Зр21.31	Д	MI	Д	ni	ni	Д	ni	Д	О	О
D3S1766	Зр21.1	MI	ni	О	О	Д	Д	Да	Д	О	О
D3S2454	Зр14.1	О	О	О	О	О	О	О	О	ni	О

Примечание: **Яич** — яичник; **Энд** — эндометрий; **О** — сохранение гетерозиготности; **Д** — делеция; **Да** — делеция с амплификацией второго аллеля; **MI** — нестабильность микросателлитов как изменение длин маркера; **ni** — не информативный случай.

Таблица 3.

**Результаты сопоставительного сравнения аллельного дисбаланса в опухолевых и нормальных тканях исследованных органов по дополнительным полиморфным локусам гена RASSF1**

Маркер	Локализация	5406	5641	11961	4748	5342
D3S2405	Зр25.3	Мет	Мет	Мет	ПМО	ПМО
D3S3047	Зр22.3	Мет	ПМО	ПМО	ПМО	ПМО
D3S2409	Зр21.31	Мет	ПМО	ПМО	ПМО	ПМО
D3S2456	Зр21.31	Мет	ПМО	Мет	ПМО	ПМО
D3S1766	Зр21.1	Мет	ПМО	Мет	ПМО	ПМО
D3S2454	Зр14.1	Мет	ПМО	ПМО	ПМО	ПМО

Примечание: **Мет** — метастаз; **ПМО** — первично-множественные опухоли.

В целом результаты проведенного исследования позволяют заключить, что природа возникновения опухолей, оцененная по результатам проведенных исследований, подтверждена в 3 случаях, но оставалась неопределенной для случая № 5641 (5Мет:5ПМО) и № 11961 (6Мет: 4ПМО).

Для большей определенности было проведено сопоставление результатов молекулярно-генетических исследований с клинико-морфологическими находками этих двух случаев.

Обе женщины обратились в РОНЦ с далеко зашедшим распространенным онкологическим процессом. Поскольку известно, что в поздних стадиях развития злокачественных опухолей могут обнаруживаться разнообразные и неспецифические мутационные изменения, использование молекулярных технологий для дифференциальной диагностики может быть ограничено при распространенности опухолевого процесса [2–5].

## ВЫВОДЫ

Таким образом, результаты проведенного пилотного исследования позволяют говорить о том, что молекулярно-генетические подходы могут иметь большое значение в дифференциации первично-множественных опухолей и первичной опухоли с метастазированием.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Попова Т. Н., Сельчук В. Ю., Баталина Л. Д. Диагностика первично-множественных синхронных злокачественных новообразований женских половых органов // Акуш. гинекол. — 2001. — № 4. — С. 45–46.
2. Brieger J., Jacob R., Riazimand H. S. et al. Chromosomal aberrations in premalignant and malignant squamous epithelium // Cancer Genet. Cytogenet. — 2003. — Vol. 144(2). — P. 148–155.
3. Castro I. M., Connell P. P., Waggoner S. et al. Synchronous ovarian and endometrial malignancies // Am. J. Clin. Oncol. — 2000. — Vol. 23(5). — P. 521–525.
4. Fujii H., Matsumoto T., Yoshida M. et al. Genetics of synchronous uterine and ovarian endometrioid carcinoma: combined analyses of loss of heterozygosity, PTEN mutation, and microsatellite instability // Hum. Pathol. — 2002. — Vol. 33(4). — P. 421–428.
5. Herrinton L. J., Voigt L. F., Weiss N. S. et al. Risk factors for synchronous primary endometrial and ovarian cancers // Ann. Epidemiol. — 2001. — Vol. 11(8). — P. 529–533.

Поступила 08.02.06

УДК 616.379-008.64:617.7:57.083.3

*A. V. Karaulov<sup>1</sup>, I. V. Evsegneeva<sup>1</sup>, E. B. Tuleneva<sup>1</sup>, M. A. Kryzhanova<sup>2</sup>, T. G. Martynova<sup>2</sup>,  
V. V. Koroleva<sup>2</sup>, T. V. Chesnokova<sup>3</sup>, V. V. Novikov<sup>2,3</sup>*

## **SOLUBLE MEMBRANE ANTIGENS CONTENT IN PATIENTS WITH DIABETES TYPE 2 EXAMINED AT THE STAGE OF DIABETIC RETINOPATHY**

<sup>1</sup> *I. M. Sechenov Academy of Medicine, Moscow*

<sup>2</sup> *I. N. Blokhin Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod*

<sup>3</sup> *N. I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod*

### **ABSTRACT**

The content of soluble membrane antigens in patients with diabetes type 2 at the stage of diabetic retinopathy has been studied by immune enzyme assay. The increased level of serum soluble CD38, CD54 (ICAM-1) antigens and soluble HLA class 1 molecules has been observed. The diabetic retinopathy is accompanied by increasing the serum adhesion molecules including CD50 (ICAM-3) and CD54 (ICAM-1), the soluble activating antigens (CD38, CD95, HLA-DR) and soluble molecules of HLA class 1. The expression of these proteins was observed at the proliferative stage of disease.

**Key words:** diabetes type 2, diabetic retinopathy, soluble antigens (CD38, CD50 (ICAM-3), CD54 (ICAM-1), CD95 (Fas)), soluble molecules of HLA class 1 and HLA-DR.

*A. B. Караулов<sup>1</sup>, И. В. Евсегнеева<sup>1</sup>, Е. Б. Тюленева<sup>1</sup>, М. А. Крыжанова<sup>2</sup>, Т. Г. Мартынова<sup>2</sup>,  
В. В. Королева<sup>2</sup>, Т. В. Чеснокова<sup>3</sup>, В. В. Новиков<sup>2,3</sup>*

## **ИЗУЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ РАСТВОРИМЫХ ФОРМ МЕМБРАННЫХ АНТИГЕНОВ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ТИПА 2 ПРИ РАЗВИТИИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ**

<sup>1</sup> *Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова*

<sup>2</sup> *Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. И.Н. Блохиной*

<sup>3</sup> *Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского*

### **РЕЗЮМЕ**

С помощью иммуноферментного метода определено содержание растворимых форм мембранных антигенов у больных сахарным диабетом (СД) типа 2 при развитии диабетической ретинопатии. Обнаружено повышение сывороточного уровня растворимых антигенов CD38 и CD54 (ICAM-1), а также растворимых молекул HLA I класса у всех больных сахарным диабетом. Установлено, что развитие диабетической ретинопатии сопровождается увеличением сывороточного содержания растворимых молекул адгезии CD50 (ICAM-3) и CD54 (ICAM-1), растворимых активационных антигенов (CD38, CD95, HLA-DR) и растворимых молекул гистосовместимости I класса, что особенно ярко наблюдается в клинически выраженной (пролиферативной) стадии заболевания, при которой выявлены достоверные различия практически по всем изучаемым показателям с группой как доноров, так и контроля.

**Ключевые слова:** сахарный диабет типа 2, диабетическая ретинопатия, растворимые антигены CD38, CD50 (ICAM-3), CD54 (ICAM-1), CD95 (Fas), растворимые молекулы HLA I класса и HLA-DR.

### **ВВЕДЕНИЕ**

В патогенезе сахарного диабета (СД) типа 2 и развитии его осложнений традиционно обращается внимание на обменные нарушения. Полагают, что конечные продукты неферментативного гликозилирования, свя-

зываясь с рецепторами различных клеток, стимулируют продукцию провоспалительных цитокинов, которые вызывают усиление экспрессии адгезивных молекул, усиливают апоптогенный потенциал клеток и задолго до клинико-инструментальных признаков обуславли-

ют развитие воспаления сосудов низкой степени. Наиболее характерное осложнение — диабетическая ретинопатия (ДР) — рассматривают как воспалительное заболевание с аутоиммунным компонентом [5; 8].

Экспериментальные исследования убедительно свидетельствуют, что каждая стадия развития ДР связана с иммунологическими механизмами развития хронического воспаления с вовлечением молекул адгезии, инициацией апоптоза, нарушением клеточных и гуморальных реакций, которые можно предотвратить блокадой адгезии лейкоцитов и угнетением апоптоза [13]. Несмотря на очевидную важность изучения растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы, таких работ при СД типа 2 не проводилось, а большинство исследований, связанных с анализом роли дифференцировочных антигенов при СД проводилось изолированно. Внимание к ним продиктовано и тем, что с помощью этих биологически важных показателей можно не только оценивать активационную и/или адгезионную способность клеток, но и, возможно, прогнозировать развитие СД и его осложнений [5].

Цель работы — исследование сывороточного содержания растворимых форм мембранных антигенов у больных СД типа 2 во взаимосвязи с развитием его осложнений.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование включало 92 пациента с СД типа 2. Все больные были разделены на три группы:

1-я группа ( $n = 40$ ) — СД типа 2 на разных стадиях (компенсации и декомпенсации) и отсутствие микрососудистых осложнений;

2-я группа ( $n = 14$ ) — длительное течение СД типа 2 и ДР в препролиферативной стадии;

3-я группа ( $n = 38$ ) — длительное течение СД типа 2 и выраженные сосудистые осложнения (пролиферативная стадия ДР).

Из исследований исключались пациенты с наличием других аутоиммунных заболеваний, воспалительных очагов любой локализации и злокачественных новообразований. Исследование больных 1-й и 3-й групп проводили в динамике в течение 6 мес. на фоне оптимальной коррекции метаболических нарушений и антиоксидантной терапии (при ДР).

Сывороточное содержание растворимых форм антигенов CD38 (sCD38), CD50 (sCD50), CD54 (sCD54), HLA-DR (sHLA-DR) и растворимых молекул HLA I класса (sHLA-I) определяли разработанными ранее иммуноферментными методами [10; 12]. Результаты выражали в условных единицах (ед./мл). Иммунофенотипирование клеток периферической крови проводили при помощи моноклональных антител серии ИКО в реакции непрямой поверхностной иммунофлюоресценции. Результаты учитывали на проточном цитофлюориметре FACScan (Becton Dickinson, США) [3]. В качестве контроля использовали образцы сыворотки крови 520 здоровых доноров, а также гепаринизированную кровь 10 практически здоровых лиц, сопоставимых по возрасту с больными СД типа 2.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнении результатов определения сывороточного уровня растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы у больных СД, лиц контрольной группы и доноров крови были выявлены следующие закономерности (табл. 1). Содержание sCD38-антигена было повышенным у больных СД без ретинопатии и у больных с пролиферативной формой ДР, у которых оно возросло в 2,5 раза. Сходная картина наблюдалась при исследовании уровня sCD95-антигена, хотя достоверные различия как с донорами крови, так и с контрольной группой наблюдались лишь при пролиферативной ДР. Больные пролиферативной ДР отличались самыми высокими показателями, отражающими концентрацию растворимых молекул адгезии: содержание антигенов sCD50 и sCD54 было повышено в сравнении с донорами крови в 1,8 и 3,4 раза соответственно. В меньшей степени наблюдалось увеличение сывороточного уровня антигена sCD54 при СД без ДР, а уровень sCD50 вообще не был изменен. У больных СД отмечалось также повышенное содержание молекул sHLA-I в сравнении с нормой. Более сложной закономерностью характеризовались изменения уровня sHLA-DR. При СД без ДР сывороточное содержание антигенов sHLA-DR не отличалось от нормы, но при развитии ДР в препролиферативной стадии отмечалось достоверное уменьшение, а при пролиферативной, напротив, увеличение содержания sHLA-DR (см. табл. 1).

Таблица 1.

### Содержание растворимых форм мембранных антигенов у больных СД, ед./мл

Антиген	Норма (доноры крови)	Группа контроля (здоровые лица)	Без ретинопатии		Ретинопатия (формы)	
			Компенсированный СД	Декомпенсированный СД/бег	Препролиферативная	Проллиферативная
sCD38	200,3±65,4	230,0±96,6	380,4±97,4 ▼	322,7±61,7 ▼	173,3±42,5	555,0±120,7 ▼
sCD50	348,2±65,4	375,8±70,1	445,5±78,2	434,5±64,1	406,8±41,8	619,2±62,2 ▼
sCD54	65,0±10,0	68,9±14,2	207,9±67,3 ▼	158,2±25,8 ▼	66,9±28,2	222,9±40,6 ▼
sCD95	374,0±23,5	417,3±66,7	554,9±110,6	553,9±45,3 ▼	434,3±104,8	1222±124,4 ▼
sHLA-I	1012±36	2159±152 ▼	2553±206 ▼	2419±308,7	1940±169,1 ▼	2538±271 ▼
sHLA-DR	99,0±11,5	30,6±4,9 ▼	153,4±41,7	98,1±19,9*	22,1±3,7 ▼	203,9±52,5 ▼

\* Достоверные различия с группой контроля.

▼ Достоверные различия в сравнении с нормой (доноры крови).

Закономерное повышение сывороточного содержания растворимых молекул адгезии, обладающих проангиогенными свойствами, отмечается нами при ДР. Оно также сопровождается повышением содержания растворимых форм активационных молекул, Fas-антигена и антигенов гистосовместимости. ДР, в патогенезе которой лежат нарушения межклеточных взаимодействий и активация свободнорадикальных процессов, приводит к возникновению зон окклюзий и ускорению контроля скрытой патологии в виде аутоиммунных и иных заболеваний. Значительное увеличение уровня сывороточных молекул адгезии и активации при развитии ДР отражает иммунопатогенез данного заболевания. Новообразование сосудов при ДР является ответом на ишемию, при этом новообразованные неполноценные сосуды потенциально являют-

ся местом образования микроангиопатий в пролиферативной стадии [8].

Таким образом, развитие ДР у больных СД сопровождается увеличением сывороточного содержания растворимых форм мембранных молекул адгезии, активации и молекул гистосовместимости, что особенно выражено в пролиферативной стадии заболевания, при которой выявлены достоверные различия практически по всем изучаемым показателям с группой как доноров, так и контроля.

Последние две группы также отличались между собой по сывороточному содержанию молекул sHLA-I и sHLA-DR. В последнем случае это различие достаточно существенно, что связано с возрастными особенностями сравниваемых групп. Закономерное повышение содержания растворимых молекул адгезии, обладающих проангиогенными свойствами, обнаруженное нами при ДР, сопровождается также повышением содержания растворимых форм активационных молекул, что может отражать начало аутоиммунных и иных проявлений иммунных нарушений при СД. Повышение всех изученных показателей при ДР, возможно, отражает один из механизмов активации эндотелиальных клеток, который может быть также связан с гипергликемией [9].

Молекулы адгезии обеспечивают контакт между клетками, поддерживают целостность тканей, миграцию лейкоцитов, взаимодействие клеток в процессе иммунных реакций. В инициации иммунного ответа и в формировании иммунологического синапса между лимфоцитами и антигенпредставляющими клетками важная роль отводится антигену CD50 (ICAM-3). В растворимой форме последний, связываясь с LFA-1 и DC-SIGN на поверхности антигенпредставляющих клеток, может тормозить процессы запуска иммунного ответа. После первичного контакта LFA-1 с молекулой ICAM-3 вследствие более высокой аффинности начинает доминировать связывание LFA-1 с антигеном ICAM-1. Растворимые молекулы ICAM-1 способны модулировать адгезию лейкоцитов на эндотелии сосудов и межклеточные взаимодействия [11].

Повышение сывороточного содержания растворимых молекул адгезии является неблагоприятным фактором с точки зрения хронизации воспаления и прогрессирования течения заболевания. Можно также предположить, что повышенные концентрации антигенов CD50 и CD54, приводящие к ингибированию взаимодействия ICAM-1 с LFA-1-антигеном, приводят к преимущественной дифференцировке Т-лимфоцитов в сторону Т-хелперов 2-го типа, что также неблагоприятно с точки зрения возрастания вероятности усиления активности аутоиммунных проявлений и снижения реакций клеточного иммунитета, отмеченных при СД типа 2 [4].

В неблагоприятных условиях при наличии метаболических, гемореологических, гемодинамических сдвигов указанные процессы нарастают, способствуя более интенсивному присоединению клеток к стенкам сосудов. Таким образом, создаются условия для разви-

тия ишемии с последующей выработкой факторов роста, обладающих проангиогенной активностью. Вероятно, этими причинами можно объяснить повышенное содержание молекул активации и sHLA-I у больных ДР. О напряженности иммунитета при ДР также свидетельствуют обнаруженные нами многочисленные корреляционные связи (данные не представлены).

Взаимосвязь между сывороточным содержанием растворимых форм различных мембранных антигенов обусловлена общими патогенетическими механизмами, лежащими в основе подъема уровней изучаемых параметров. Как клинические, так и экспериментальные исследования указывают на то, что метаболические нарушения не являются единственным и определяющим фактором развития иммунных нарушений при СД. Уже в ранней стадии в сосудах сетчатки глаза активируются каспазы, участвующие в формировании апоптотического сигнала, вследствие чего происходит облитерация капилляров [5]. Как только скорость гибели клеток превышает скорость репарации, образуются ацеллюлярные капилляры, начинается необратимая ишемия сетчатки с формированием пролиферативных процессов. Процесс пролиферации запускается сосудистым эндотелиальным фактором роста (VEGF), экспрессия которого определяется концентрацией глюкозы, гликозилированными продуктами и свободными радикалами, образуемыми в избытке в результате как местного, так и системного окислительного стресса [14].

Именно поэтому наряду с оптимальной коррекцией метаболических нарушений при СД типа 2 необходимо назначение препаратов с доказанной антиоксидантной активностью. Мы применяли целый комплекс препаратов, относящихся к этой группе: эмоксипин, гистохром и милдронат. Длительные наблюдения за больными убедительно свидетельствуют об их эффективности. Положительный результат иммунореабилитации при использовании антиоксидантов (эмоксипина, гистохрома, милдроната) выразился в более выраженном улучшении зрения, рассасывании кровоизлияний и положительной динамике показателей микроциркуляции на глазном дне, что коррелировало с изменениями в гемостазиограмме и восстановлением почти всех исходно нарушенных уровней растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы (табл. 2). Анализ этих данных показывает, что сразу же после лечения отмечается тенденция к нормализации уровня sCD95, которая усиливается спустя 3 и 6 мес. после начала лечения. Это подтверждает концепцию об активном участии процессов апоптоза в реализации механизмов стресса и эффективности антиоксидантов в предотвращении различных негативных эффектов клинических проявлений стресса [7]. Быстрая динамика регуляторной молекулы, модулирующей активность апоптоза, может быть связана и с изменением цитокинового профиля, который оказывает значительное влияние на эти процессы.

Почти синхронные изменения концентраций молекул адгезии (sCD50, sCD50, sCD38), которые норма-

**Таблица 2.**  
Сывороточный уровень растворимых форм мембранных антигенов у больных ДР в пролиферативной стадии, ед./мл

Антиген	Норма	До лечения	После лечения	Через 3 мес.	Через 6 мес.
sHLA-I	1012,6±36,2	2386,3±187,4*	2294,6±132,0*	2809,7±205,2*	1479,3±67,4*
sHLA-DR	99,1±11,5	183,4±24,6*	216,8±44,1*		
sCD38	200,8±17,3	569,1±43,0*	650,9±73,1*	437,0±36,8*	216,0±26,5
sCD50	353,8±65,9	591,1±98,0*	678,1±127,5*	856,3±108,3*	406,6±47,2
sCD54	65,2±10,3	238,4±41,9*	316,2±29,7*	125,9±14,0*	81,5±12,6
sCD95	374,7±23,8	1331,5±108,3*	862,4±53,9*	626,7±45,7*	531,3±39,1*

\* Достоверные различия в сравнении с нормой (доноры крови).

лизуются только спустя 6 мес. с начала терапии, подтверждают ключевую роль изменений растворимых молекул адгезии в быстром прогрессировании ДР, что продемонстрировано ранее для sCD62-антигена (E-селектин) [9]. Об этом же свидетельствуют наши наблюдения, подтверждающие необходимость повторных курсов антиоксидантной терапии для получения оптимального клинического эффекта. Именно благодаря окислительному стрессу регистрируется дисфункция эндотелия при СД, которая может предотвращаться при назначении препаратов, обладающих антиоксидантной активностью [2; 13].

Нам не удалось наблюдать нормализации сывороточного уровня антигенов sHLA-DR в период нахождения больного в стационаре. Повышенный уровень sHLA-I имел тенденцию к снижению только спустя 6 мес. после начала лечения, что указывает на независимость этого параметра от проводимой терапии. Возможно, это объясняется тем, что sHLA-I скорее отражает состояние  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, которое может не изменяться при проведении антиоксидантной терапии. После терапии каких-либо корреляционных связей между изученными параметрами мы не наблюдали.

Исследование динамики популяционного состава лимфоцитов у больных ДР указывает на отсутствие существенных изменений по основным изучаемым показателям в сравнении с нормой (табл. 3). Отмечалось только повышение числа CD95 (Fas)-положительных клеток, которое не изменялось в период пребывания больного в стационаре. По-видимому, активация процесса апоптоза многих клеточных систем при ДР является определенной закономерностью. Повышенный апоптотический потенциал лимфоцитов при ДР может лежать в основе иммунных нарушений, наблюдаемых при ДР [13], что является основанием для дополнительного назначения иммунотерапии [6]. Нам также не удалось выявить каких-либо достоверных корреляционных связей между сывороточным уровнем растворимых антигенов и относительным содержанием антиген-положительных клеток при ДР. Отсутствие таких связей свидетельствует о независимом характере изменений изучаемых иммунологических параметров при ДР.

Таким образом, нам удалось выявить существенные изменения в сывороточном содержании раство-

**Таблица 3.**  
Динамика популяций лимфоцитов периферической крови больных ДР в процессе терапии, %

Антиген+ клетки	До терапии	После терапии	Норма
CD54 <sup>+</sup>	6,4±0,43	6,5±0,51	9,3±6,6
CD56 <sup>+</sup>	5,2±0,32	4,7±0,38	5,8 ±3,2
CD25 <sup>+</sup>	2,8±0,2	3,4±0,3	4,9±3,1
CD95 <sup>+</sup>	44,1±5,0*	39,4±4,7	25,6±12,3
CD38 <sup>+</sup>	28,0±3,6	25,2±2,9	28,5±4,8
HLA-DR <sup>+</sup>	13,2±1,58	13,5±1,9	9,1±2,9

\* Достоверные различия в сравнении с нормой (доноры крови)

римых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы при СД типа 2, установить их роль в развитии осложнений, в частности ДР, и возможность использования этих показателей при осуществлении мониторинга иммунных нарушений в процессе лечения. На основании результатов проведенных исследований и анализа данных литературы можно утверждать, что развитие ДР сопровождается комплексом иммунных нарушений: имеет место активация эндотелиальных клеток и лимфоцитов, нарастает апоптотический потенциал клеток, создаются условия для аутоиммунных нарушений и снижаются реакции клеточного иммунитета. В такой среде трудно осуществить эффективный иммунный ответ. Поэтому увеличивается возможность развития инфекционных и иных осложнений. Часть этих изменений связана и с возрастными изменениями, в основе которых также лежит окислительное повреждение, вызванное нормальными процессами метаболизма [15], чьи уровень и направленность меняются на фоне сахарного диабета [1; 4]. В процессе работы нам также удалось не только обосновать патогенетическую направленность антиоксидантной терапии, но и показать целесообразность использования изучаемых показателей сывороточного уровня растворимых форм мембранных антигенов в реализации программы иммунореабилитации в условиях длительных наблюдений. В процессе лечения, направленного только на контроль уровня сахара, возникновение ДР практически неизбежно. Включение в комплексную терапию больных СД типа 2 антиоксидантов может предотвратить это осложнение.

## ВЫВОДЫ

У больных сахарным диабетом типа 2 отмечается увеличение сывороточного содержания растворимых антигенов CD38, CD50 и растворимых молекул HLA I класса.

Развитие и прогрессирование диабетической ретинопатии сопровождается увеличением сывороточного уровня растворимых молекул адгезии, активации, растворимого Fas-рецептора и растворимых молекул гистосовместимости I класса, что корректируется назначением антиоксидантной терапии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин М. И. Сахарный диабет. — М.: Медицина, 2000. — 350 с.
2. Балаболкин М. И., Клебанова Е. М. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений СД (лекция) // Пробл. эндокринол. — 2000. — Т. 46, № 6. — С. 29–34.
3. Барышников А. Ю., Шишкин Ю. В. Программированная клеточная смерть (апоптоз). — М.: УРСС, 2002. — 318 с.
4. Дедов И. И., Фадеев В. В. Введение в диабетологию: Руководство для врачей. — М., 1998. — 450 с.
5. Деягин В. М., Румянцев А. Г., Мельникова М. Б. Патогенез диабетической ретинопатии/ретинита // Вопр. гематол., онкол. и иммунопатол. в педиатр. — 2003. — Т. 2, № 4. — С. 67–70.
6. Клиническая иммунология и аллергология. (2-е изд.) / Под ред. А. В. Караулова. — М.: МИА, 2002. — 651 с.
7. Караулов А. В. Механизмы развития иммунологических нарушений при стрессе и методы их коррекции. Руководство по реабилитации лиц, подвергшихся стрессорным нагрузкам. — И., 2004. — С. 326–337.
8. Кочемасова Т. В. Состояние эндотелия и адгезия лейкоцитов при сахарном диабете (Обзор литературы) // Сахарный диабет. — 2000. — № 3. — С. 59–62.
9. Кочемасова Т. В., Шестакова М. В., Миленская Т. М. и др. Участие Е-селектина в развитии микро-  
сосудистых осложнений сахарного диабета 1 типа // Сахарный диабет. — 2002. — № 1. — С. 50–52.
10. Худякова Н. Е., Новиков В. В., Кравченко Г. А. и др. Уровень растворимых антигенов HLA I и II классов в сыворотке крови ВИЧ-инфицированных лиц // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. — 2004. — № 1. — С. 42–45.
11. Caron-Leslie A. M., Cidlowski J. A. Evaluation of the role of protein synthesis inhibition in apoptosis in glucocorticoid sensitive and glucocorticoid resistant S42 cell // Endocrinol. J. — 1994. — Vol. 2. — P. 47–52.
12. Khudyakova N. E., Egorova N. I., Pitytsina Ju. S. et al. Serum Level of Soluble Adhesion Molecules in HIV Infected with Markers of Other Viral Diseases // Rus. J. Immunol. — 2003. — No. 4. — P. 245–250.
13. Mohr S., Xi X., Tang J. et al. Caspase activation in retinas of diabetic and galactosemic mice and diabetic patients // Diabetes. — 2002. — Vol. 51, No. 4. — P. 1171–1179.
14. Schedlowski M. Stress, Stress Hormones and the Immune System // Immunol. Today. — 1998. — No. 19. — 535 p.
15. Schigenaga M. K., Hagen T. M., Ames B. N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1994. — Vol. 91. — P. 10771–10778.

Поступила 27.01.2006.

УДК 615.453.42 «Циклоспорин»

*A. P. Arzamastsev<sup>1</sup>, N. P. Sadtchikova<sup>1</sup>, M. V. Ledovskikh<sup>2</sup>, E. B. Nechaeva<sup>3</sup>, S. G. Larionova<sup>3</sup>,  
S. E. Milkina<sup>3</sup>, V. N. Baykova<sup>2</sup>*

## INVESTIGATION OF CYCLOSPORINE A CAPSULE FORMULATIONS STABILITY

<sup>1</sup> *I. M. Sechenov Moscow Medical Academy, Moscow*

<sup>2</sup> *N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow*

<sup>3</sup> *Federal Research Center of Medical Products Examination and Standardization, Moscow*

### ABSTRACT

This article deals with the stability investigation of capsule formulations of cyclosporine A, which is the first line immunosuppressive agent in bone marrow and solid organ transplantations. The quality control of cyclosporine A preparations was carried out by estimation of «Assay» and «Related substances» criteria. 60-minutes dissolution profiles of cyclosporine A in soft gelatine capsules were investigated. It has been shown that cyclosporine A content after expiration dating period has decreased. At the same time related substances total content as well as that of individual identified related substances (cyclosporine H, dihydrocyclosporine A, cyclosporine V, cyclosporine D, isocyclosporine A) has increased. The decrease of dissolution index and changes in dissolution profiles of cyclosporine A in investigated preparations after expiration dating period have been shown. By the example of cyclosporine A capsule formulations, the advisability of the study of active substance release along with «Assay» and «Related substances» criteria have been demonstrated.

**Key words:** cyclosporine A, stability, related substances, assay, dissolution.

*A. П. Арзамасцев<sup>1</sup>, Н. П. Садчикова<sup>1</sup>, М. В. Ледовских<sup>2</sup>, Е. Б. Нечаева<sup>3</sup>, С. Г. Ларионова<sup>3</sup>,  
С. Е. Милкина<sup>3</sup>, В. Н. Байкова<sup>2</sup>*

## ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ КАПСУЛИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ЦИКЛОСПОРИНА А

<sup>1</sup> *ММА им. И. М. Сеченова, Москва*

<sup>2</sup> *ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*

<sup>3</sup> *ФГУ НЦ ЭСМП Росздравнадзора, Москва*

### РЕЗЮМЕ

Данная статья посвящена изучению стабильности капсулированных лекарственных форм циклоспорина А, являющегося ключевым звеном иммуносупрессивной терапии при проведении трансплантаций костного мозга и солидных органов. Оценка качества мягких желатиновых капсул циклоспорина А различных производителей проведена по показателям «Содержание действующего вещества» и «Посторонние примеси». Изучены профили растворения циклоспорина А в исследуемых препаратах. Показано, что по истечении срока годности препаратов наблюдается уменьшение содержания циклоспорина. При этом содержание примесей возрастает как суммарно, так и в отношении индивидуальных родственных соединений: циклоспорина Н, дигидроциклоспорина А, циклоспорина V, циклоспорина D и изоциклоспорина А. Установлено, что по истечении срока годности снижается показатель «Растворение» и изменяется профиль высвобождения циклоспорина А из капсулированных лекарственных форм. На примере исследуемых препаратов показана целесообразность изучения характера высвобождения действующего вещества наряду с нормируемыми показателями «Посторонние примеси» и «Содержание действующего вещества» для всесторонней оценки качества лекарственных форм.

**Ключевые слова:** циклоспорин А, стабильность, содержание действующего вещества, посторонние примеси, растворение.

### ВВЕДЕНИЕ

В современной трансплантологии препараты циклоспорина А являются ключевым звеном иммуносупрессивной терапии при проведении трансплантаций костного мозга и солидных органов. Несмотря

на появление в 90-х годах прошлого века новых иммунодепрессантов, циклоспорин остается препаратом выбора, обеспечивающим радикальное увеличение сроков выживаемости пациентов и трансплантатов [8].



В последние 10 лет актуальнейшей проблемой является введение в клиническую практику воспроизведенных (дженерики) лекарственных форм циклоsporина А [3; 7]. В настоящее время на российском фармацевтическом рынке присутствуют как оригинальный препарат циклоsporина А сандиммун неорал («Новартис Фарма», Швейцария), так и дженерики: панимун биорал («Панацея Биотек», Индия), циклоsporин гексал («Гексал», Германия), циклопен («Верофарм», РФ), экорал («Айвекс», США). Их пероральные лекарственные формы представляют собой различные дисперсные системы, включающие, наряду с действующим веществом, липофильные и гидрофильные растворители, ПАВ и другие вспомогательные вещества.

Циклоsporин А представляет собой циклический олигопептид, состоящий из 11 аминокислотных остатков, 7 из которых N-метилированы (рис. 1). Циклоsporин А является одним из метаболитов, продуцируемых несовершенными грибами *Tolypocladium inflatum*. Другие циклоспорины (В, С, D, E, F, G, H, I), синтезируемые этими грибами, отличаются в своей структуре от циклоспорина А по строению углеводородного радикала во 2, 6, 7 или 11-м аминокислотном остатке.

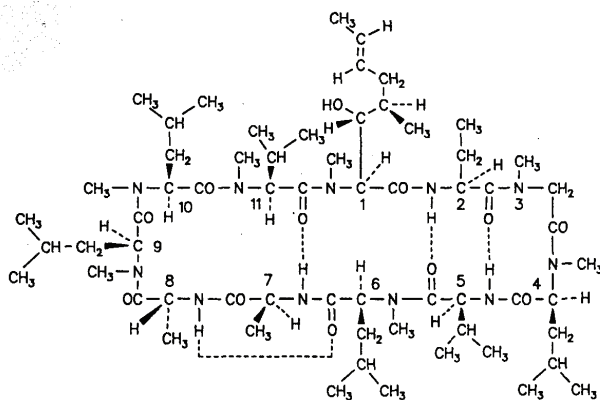


Рис. 1. Структура циклоспорина А

Монографии по субстанции циклоспорина А представлены в Американской (2004), Британской (2004), Европейской (2002) и Японской (2001) Фармакопеях, в Фармакопее США также имеются данные по лекарственным формам циклоспорина А — капсулы, раствор для внутреннего применения и концентрат для инъекций.

Оценка качества лекарственных форм циклоспорина А по показателям «Содержание действующего вещества» и «Посторонние примеси» представляется крайне важной, учитывая лабильность молекулы нативного вещества и возможность образования родственных соединений. Монографии вышеуказанных фармакопей на субстанцию циклоспорина А лимитируют суммарное количество неидентифицированных примесей (не более 1,5 %), а также содержание каждой единичной примеси (не более 0,7 %). Британская и Ев-

ропейская Фармакопеи приводят перечень возможных примесей в субстанции циклоспорина А: циклоспорины В, С, D, E, G, H, L, T, U, V, изоциклоспорин А и дигидроциклоспорин А. Однако нормативной документацией не предусмотрено испытание на посторонние примеси в лекарственных формах [4–6; 9].

Изучение стабильности препаратов циклоспорина А при хранении проводилось по показателям «Содержание действующего вещества» и «Посторонние примеси». Кроме того, мы посчитали целесообразным исследовать профили растворения циклоспорина А в лекарственных формах, поскольку изменение их во времени дает дополнительную информацию при изучении стабильности лекарственных средств и для обоснования срока годности [1; 2].

В данной статье представлены результаты изучения стабильности капсулированных лекарственных форм циклоспорина А различных производителей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Целью исследования явилось изучение стабильности в процессе хранения мягких желатиновых капсул циклоспорина А, производимых различными компаниями: сандиммун неорал («Новартис Фарма», Швейцария), экорал («Айвекс», США), циклоспорин гексал («Гексал», Германия). В качестве контролируемых показателей были выбраны «Содержание действующего вещества», «Посторонние примеси» и «Растворение».

Для проведения эксперимента использованы препараты с истекшим сроком годности (сандиммун неорал, 50 мг, срок годности до 07.2004; экорал, 50 мг, срок годности до 04.2004; циклоспорин гексал, 50 мг, срок годности до 06.2004) и такие, срок годности которых ограничен 2006 г. (сандиммун неорал, 50 мг, срок годности до 05.2006; экорал, 50 мг, срок годности до 06.2006; циклоспорин гексал, 50 мг, срок годности до 04.2006). В наше распоряжение были предоставлены стандарты примесей циклоспорина Н, изоциклоспорина А и дигидроциклоспорина А, а также смесь стандартов циклоспорина А и родственных соединений. Определение содержания циклоспорина А и посторонних примесей в лекарственных формах проводилось методом ВЭЖХ.

### Условия хроматографирования

#### Реагенты

Кислота ортофосфорная 85%, ДиазМ

Ацетонитрил марки «для ВЭЖХ», Fluka

Метанол марки «extra pure», MERCK

Стандарт циклоспорина А, чистота 99,78 %, IVAX

Терт-бутилметилловый эфир марки «для ВЭЖХ», Sigma Aldrich

Вода бидистиллированная

*Подвижная фаза:* вода/ацетонитрил/терт-бутилметилловый эфир/кислота ортофосфорная 85% в соотношении 500:450:150:1,3.

*Оборудование:* хроматограф Agilent 1100 Series; колонка LiChrospher 100 RP18, 5 мкм.

*Температура колонки:* 80 °С.

*Скорость потока:* 1,5 мл/мин.

Объем пробы: 20 мкл.

Вид градиента: изократический.

Детектирование: УФ-детектор, длина волны 214 нм.

Приготовление стандартного раствора циклоспорина А (1). Точную навеску 0,0102 г стандарта циклоспорина А растворяли в 10 мл растворителя (смесь ацетонитрила и воды бидистиллированной в соотношении 1:1). Концентрация стандартного раствора циклоспорина А (1) составила 1,02 мг/мл.

Приготовление стандартного раствора циклоспорина А (2). 100 мкл стандартного раствора циклоспорина А (1) помещали в мерную колбу на 10 мл и доводили объем растворителем. Концентрация стандартного раствора циклоспорина А (2) составила 0,0102 мг/мл.

Приготовление раствора образца. Вскрывали 5 капсул исследуемого препарата с помощью скальпеля, количественно переносили их содержимое растворителем в мерную колбу на 250 мл и доводили объем растворителем. Перемешивали содержимое колбы в течение 10 мин на магнитной мешалке и фильтровали с использованием мембранного фильтра «Капрон» («БиоХимМак») с размером пор 0,2 мкм.

Пригодность хроматографической системы определялась по критериям, описанным в Американской Фармакопее 27-го издания [9].

Время удерживания пика циклоспорина А в стандартном растворе составило  $18,34 \pm 0,05$  мин ( $n=5$ ).

Фактор симметрии пика стандартного раствора циклоспорина А (1), рассчитанный по формуле (1), составил 0,93.

$$A_s = \frac{W_{0,05}}{2d}, \quad (1)$$

где  $W_{0,05}$  — ширина пика у  $1/20$  пиковой высоты;  $d$  — расстояние между перпендикуляром, опущенным от пикового максимума и ведущего края пика к  $1/20$  пиковой высоты.

Эффективность колонки (очевидное число теоретических тарелок), рассчитанная по формуле (2), составила 6947.

$$N = 5,54 \left( \frac{t_r}{W_{0,5}} \right)^2 = 16 \left( \frac{t_r}{W_s} \right)^2, \quad (2)$$

где  $N$  — очевидное число теоретических тарелок;  $t_r$  — время удерживания или расстояние вдоль базисной линии от точки введения до середины пика соответствующего компонента (определяется как перпендикуляр, опущенный от максимума пика до его базисной линии);  $W_{0,5}$  — ширина пика у  $1/2$  основания высоты;  $W_s$  — ширина пика.

Все параметры должны быть выражены в одних и тех же единицах (время или расстояние).

Воспроизводимость результатов выражалась как процент стандартного отклонения последовательной серии измерений стандартного раствора, рассчитывалась по формуле (3) и составила 0,54 % ( $n=5$ ).

$$RSD\% = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}, \quad (3)$$

где  $y_i$  — площадь пика стандартного раствора;  $\bar{y}$  — среднее значение;  $n$  — выборка.

Количественное содержание циклоспорина А рассчитывали по формуле (4):

$$X = \frac{y_T \cdot a \cdot V \cdot m}{y_S \cdot b \cdot q \cdot n \cdot 100} 100\%, \quad (4)$$

где  $X$  — содержание циклоспорина А, %;  $y_T$  — площадь пика циклоспорина А на хроматограмме испытуемого образца;  $y_S$  — площадь пика циклоспорина А на хроматограмме стандартного раствора (1);  $a$  — масса навески стандарта циклоспорина А (мг);  $V$  — объем раствора образца (мл);  $m$  — чистота стандарта циклоспорина А, равна 99,78 %;  $b$  — объем стандартного раствора циклоспорина А (мл) (1);  $q$  — заявленное содержание циклоспорина А в одной капсуле (мг);  $n$  — количество капсул, взятых для приготовления испытуемого образца.

Процентное содержание посторонних примесей рассчитывали по формуле (5):

$$X = \frac{y_T \cdot a \cdot V \cdot m}{y_S \cdot b \cdot q \cdot n \cdot 100 \cdot 100} 100\%, \quad (5)$$

где  $X$  — содержание примеси, процент от заявленного количества циклоспорина А в одной капсуле;  $y_T$  — площадь пика примеси на хроматограмме испытуемого образца;  $y_S$  — площадь пика циклоспорина А на хроматограмме стандартного раствора (2);  $a$  — масса навески стандарта циклоспорина А (мг);  $V$  — объем раствора образца (мл);  $m$  — чистота стандарта циклоспорина А, равна 99,78 %;  $b$  — объем стандартного раствора циклоспорина А (мл) (1);  $q$  — заявленное содержание циклоспорина А в одной капсуле (мг);  $n$  — количество капсул, взятых для приготовления испытуемого образца; 100 — фактор разведения стандартного раствора циклоспорина А (2) по сравнению со стандартным раствором (1).

Изучение высвобождения циклоспорина А из мягких желатиновых капсул проводилось в условиях теста «Растворение» [2].

Среда растворения: 0,1н хлористоводородная кислота с 0,5% натрия додецилсульфата.

Объем среды растворения: 500 мл.

Температура:  $37 \pm 0,5$  °C.

Прибор: Distek Dissolution System 2100С типа «Лопастная мешалка».

Скорость вращения лопастей: 75 об./мин.

Отбор проб осуществлялся каждые 10 мин в течение

ние 1 ч. Отобранные аликвоты фильтровали с использованием мембранного фильтра «Капрон» («БиоХимМак») с размером пор 0,2 мкм.

Определение содержания циклоспорина А, высвободившегося в среду растворения, проводилось методом ВЭЖХ.

Условия хроматографирования

Подвижная фаза: ацетонитрил : кислота ортофосфорная 0,1% в соотношении 670:330.

Оборудование: хроматограф Agilent 1100 Series; колонка «Диасфер-110-С<sub>18</sub>» 150 мм × 4 мм, 7 мкм.

Температура колонки: 80 °С.

Скорость потока: 2 мл/мин.

Объем пробы: 20 мкл.

Вид градиента: изократический.

Детектирование: УФ-детектор, длина волны 214 нм.

Приготовление стандартного раствора циклоспорина А. Точную навеску 12,2 мг стандарта циклоспорина А растворяли в 25 мл метанола, 1 мл полученного стандартного раствора доводили средой растворения до 10 мл. Концентрация рабочего стандарта составила 0,0488 мг/мл.

Для оценки высвобождения циклоспорина А рассчитывали показатель растворения по формуле (6):

$$X = \frac{Y_t \cdot a \cdot V \cdot m}{Y_s \cdot b \cdot q \cdot 100} 100 \%, \quad (6)$$

где  $X$  — показатель растворения (%);  $Y_t$  — площадь пика циклоспорина А на хроматограмме испытуемого образца;  $Y_s$  — площадь пика циклоспорина А на хроматограмме стандартного раствора;  $a$  — масса навески стандарта циклоспорина А (мг);  $q$  — заявленное содержание циклоспорина А в одной капсуле (мг);  $b$  — фактор разведения стандарта циклоспорина А, равен 250;  $V$  — объем среды растворения (мл);  $m$  — чистота стандарта циклоспорина А, равна 99,78 %.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения содержания циклоспорина А и посторонних примесей в исследуемых препаратах представлены в табл. 1.

Как следует из приведенных данных, содержание действующего вещества (циклоспорин А) в препаратах сроком годности до 2006 г. находится в пределах регламентируемых норм (90–110 %) [9] и составляет для сандиммуна неорала 96,03±0,29 %, для экорала 94,17±0,19 %, для циклоспорина гексал 95,16±0,16 %. В то же время хроматографическая картина различна в отношении как числа посторонних примесей, так и их количества. Содержание циклоспорина Н в экорале составило 0,06±0,002 %, в 2 других препаратах обнаружены только следовые количества этой примеси. Дигидроциклоспорин А и циклоспорин V присутствуют во всех препаратах в количестве от 0,26±0,02 (экорал) до 0,39±0,03 % (сандиммун неорал). Циклоспорин D обнаружен в циклоспорине гексал в количестве

Таблица 1.  
Определение содержания циклоспорина А и посторонних примесей в мягких желатиновых капсулах разных производителей

Числовые показатели	Средняя концентрация, %(n=5)					
	Срок годности					
	Сандиммун неорал		Экорал		Циклоспорин гексал	
	до 2004 г.	до 2006 г.	до 2004 г.	до 2006 г.	до 2004 г.	до 2006 г.
Циклоспорин А	91,53±0,25	96,03±0,29	88,27±0,32	94,17±0,19	90,39±0,38	95,16±0,16
Примеси						
Циклоспорин Н	0,40±0,04	Следовые количества	0,19±0,01	0,06±0,002	Следовые количества	
Сумма дигидроциклоспорина А и циклоспорина V	0,96±0,04	0,39±0,03	0,91±0,01	0,26±0,02	0,38±0,02	0,29±0,02
Циклоспорин D	Следовые количества				0,35±0,03	0,23±0,02
Изоциклоспорин А	0,75±0,05	0,40±0,03	0,56±0,03	0,32±0,02	0,28±0,03	0,11±0,02
Неидентифицированные примеси (сумма)	3,55±0,46	0,81±0,12	5,63±0,34	1,76±0,22	4,39±0,51	0,92±0,17

0,23±0,02 %, в других препаратах данная примесь найдена в следовых количествах. Во всех препаратах отмечено присутствие изоциклоспорина А, содержание которого варьирует от 0,11±0,02 (циклоспорин гексал) до 0,40±0,03 % (сандиммун неорал). Суммарное содержание неидентифицированных примесей в исследуемых препаратах составляло от 0,81±0,12 (циклоспорин гексал) до 1,76±0,22 % (экорал).

При исследовании образцов с истекшим сроком годности (до 2004 г.) отмечено снижение уровня действующего вещества (циклоспорин А) на 4,5 %, 5,9 % и 4,77 % в сандиммуне неорале, экорале и циклоспорине гексал соответственно при возрастании содержания примесных соединений. Так, в экорале содержание циклоспорина Н увеличилось на 0,13 %, в сандиммуне неорале — на 0,4 %. Содержание дигидроциклоспорина А и циклоспорина V возросло на 0,09, 0,57 и 0,65 % в циклоспорине гексал, сандиммуне неорале и экорале соответственно. Количество циклоспорина D в циклоспорине гексал увеличилось на 0,12 %. Уровень изоциклоспорина А в сандиммуне неорале возрос на 0,35 %, в экорале — на 0,24 %, в циклоспорине гексал — на 0,17 %. Суммарное содержание неидентифицированных примесей увеличилось на 2,74, 3,87 и 3,47 % в сандиммуне неорале, экорале и циклоспорине гексал соответственно.

Таким образом, снижение содержания действующего вещества в препаратах с истекшим сроком годности и соответствующее увеличение уровня примесей в образцах с истекшим сроком годности позволяет предположить образование родственных соединений из циклоспорина А в процессе хранения.

Для получения наиболее полной картины изменения качества препаратов циклоспорина А в процессе хранения мы считали целесообразным наряду с испытаниями «Содержание действующего вещества» и

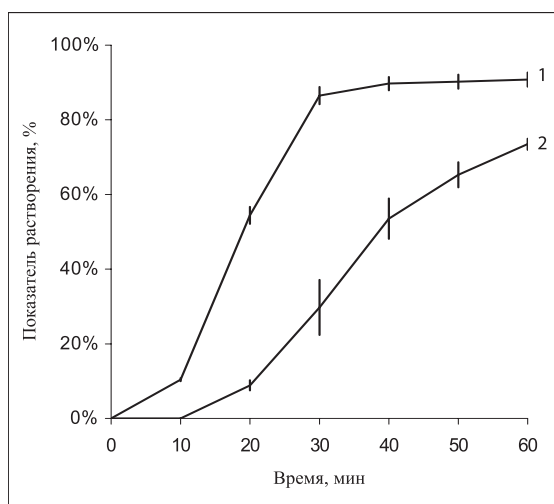
«Посторонние примеси» изучить его высвобождение из исследуемых образцов. Результаты проведенной работы представлены в табл. 2.

Таблица 2.

### Высвобождение циклоsporина А из мягких желатиновых капсул разных производителей

Время, мин	Значение показателя растворения, % (n=6)					
	Срок годности					
	Сандиммун неорал		Экорал		Циклоsporин гексал	
	до 2004 г.	до 2006 г.	до 2004 г.	до 2006 г.	до 2004 г.	до 2006 г.
0	0	0	0	0	0	0
10	0	10,42±0,41	57,05±5,58	15,91±1,88	4,37±0,44	34,39±0,45
20	8,87±1,38	54,40±2,28	62,18±2,86	47,73±3,92	18,86±2,10	76,19±1,81
30	29,76±1,39	86,48±2,32	63,18±3,09	59,29±4,18	59,66±4,25	88,55±0,35
40	53,52±5,40	89,73±1,80	65,36±1,94	72,29±1,40	84,69±1,35	89,29±0,69
50	65,27±3,37	90,21±1,89	67,27±1,34	81,21±0,75	86,98±0,76	90,47±0,41
60	73,46±1,53	90,76±1,91	68,33±1,18	86,07±0,85	87,99±0,58	91,77±0,42

На основании данных результатов были получены профили растворения. На рис. 2 представлены профили растворения циклоsporина А в препарате сандиммун неорал.



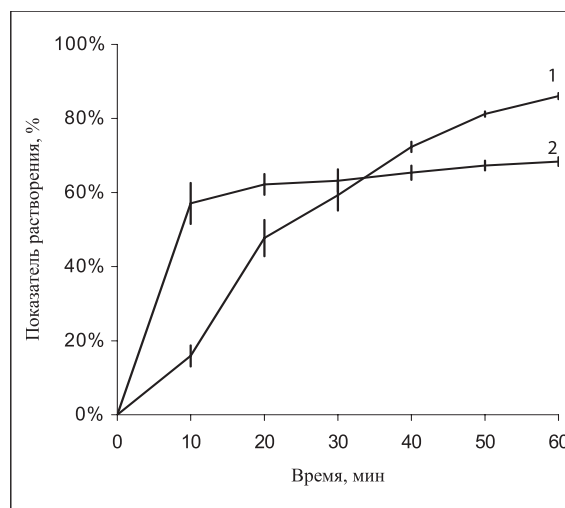
**Рис. 2.** Профили растворения циклоsporина А в препарате сандиммун неорал:

1 — профиль растворения препарата сандиммун неорал (Новартис) сроком годности до 2006 г.; 2 — профиль растворения препарата сандиммун неорал (Новартис) сроком годности до 2004 г.

Как следует из рис. 2, высвобождение циклоsporина А из препарата сроком годности до 2006 г. на участке 0–10 мин происходит со скоростью примерно 1,6 %/мин, на участке 10–30 мин — 3,8 %/мин, на участке 30–50 мин — примерно 1,2 %/мин. В конечной точке исследования (60 мин) показатель растворения достигает 90,76±1,91 %. Высвобождение циклоsporина А из препарата с истекшим сроком годности начинается только с 10-й минуты и происходит достаточно равномерно (прирост высвобождения на участке 10–20 мин составляет примерно 0,9 %/мин, на участке 20–40 мин — примерно 2,2 %/мин и на участке 40–60 мин — при-

мерно 1 %/мин). В конечной точке исследования высвобождение циклоsporина А из капсул с истекшим сроком годности составляет 73,46±1,53 %, что на 17,3 % ниже чем у препарата сроком годности до 2006 г.

На рис. 3 представлены профили растворения циклоsporина А в препарате экорал.



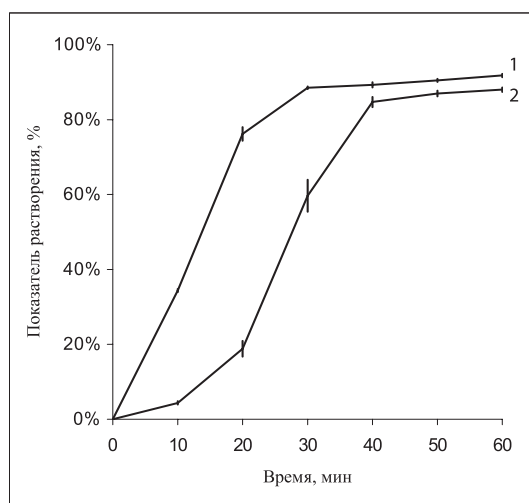
**Рис. 3.** Профили растворения циклоsporина А в препарате экорал:

1 — профиль растворения препарата экорал (Айвэкс) сроком годности до 2006 г.; 2 — профиль растворения препарата экорал (Айвэкс) сроком годности до 2004 г.

Как следует из рис. 3, высвобождение циклоsporина А из препарата сроком годности до 2006 г. на участке 0–10 мин происходит со скоростью примерно 1,6 %/мин, на участке 10–20 мин — 3,2 %/мин, на участке 30–60 мин — примерно 1 %/мин. В конечной точке исследования (60 мин) показатель растворения достигает 86,07±0,85 %. Высвобождение циклоsporина А из экорала с истекшим сроком годности на участке 0–10 мин происходит со скоростью 5,7 %/мин. Затем прирост высвобождения резко падает, составляя 0,5 %/мин на участке 10–20 мин и 0,1 %/мин на участке 50–60 мин. Растворение циклоsporина А в конечной точке наблюдения в экорале сроком годности до 2004 г. составляет 68,33±1,18 %, что на 17,74 % ниже растворения в капсулах сроком годности до 2006 г.

На рис. 4 представлены кривые высвобождения циклоsporина А из препарата циклоsporин гексал.

Как видно из рис. 4, высвобождение циклоsporина А из препарата сроком годности до 2006 г. на участке 0–20 мин происходит со скоростью 3,8 %/мин. Далее прирост высвобождения снижается от 1,2 %/мин на участке 20–30 мин до 0,1 %/мин на участке 30–60 мин. В конечной точке исследования (60 мин) показатель растворения составляет 91,77±0,42 %. Скорость высвобождения циклоsporина А из циклоsporина гексал с истекшим сроком годности на участке 0–10 мин составляет 0,4 %/мин, на участке 10–20 мин — 1,4 %/мин. Прирост высвобождения на участке 20–40 мин — примерно 3,3 % и затем снижается до 0,16 %/мин на участке 40–60 мин. В конечной точке



**Рис. 4.** Профили растворения циклоsporина А в препарате циклоsporин гексал:

**1** — профиль растворения препарата циклоsporин гексал (Гексал) сроком годности до 2006 г.; **2** — профиль растворения препарата циклоsporин гексал (Гексал) сроком годности до 2004 г.

исследования показатели растворения циклоsporина А в циклоsporине гексал сроком годности до 2006 г. и до 2004 г. достигают сопоставимых значений —  $91,77 \pm 0,42$  и  $87,99 \pm 0,58$  % соответственно.

### ВЫВОДЫ

В результате исследования капсулированных препаратов циклоsporина А с разными сроками годности было установлено изменение их качества по показателям «Содержание действующего вещества» и «Посторонние примеси». Показано, что по истечении срока годности наблюдается уменьшение содержания циклоsporина А. При этом содержание примесей возрастает как суммарно, так и в отношении индивидуальных родственных соединений — циклоsporина Н,

дигидроциклоsporина А, циклоsporина V, циклоsporина D и изоциклоsporина А.

Установлено, что по истечении срока годности снижается показатель «Растворение» и изменяется профиль высвобождения циклоsporина А из капсулированных лекарственных форм.

На примере препаратов циклоsporина А показана целесообразность исследования характера высвобождения действующего вещества наряду с нормируемыми показателями «Посторонние примеси» и «Содержание действующего вещества» для всесторонней оценки качества.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Арзамасцев А. П., Садчикова Н. П., Лутцева Т. Ю. Сравнительная оценка уровня требований к испытанию «Растворение» // Хим.-фарм. журн. — 2003. — Т. 37, № 1. — С. 39–45.
2. Общая фармакопейная статья 42-0003-04 «Растворение».
3. Barr W. H. Cyclosporine: The case for expanding bioequivalence criteria to include measures of individual bioequivalence in relevant population subsets // Transplant. Proc. — 1999. — No. 31 (Suppl. 3A) — P. 25S–30S.
4. British Pharmacopoeia, 2004.
5. European Pharmacopoeia 4th edition, 2002.
6. Japanese Pharmacopoeia XIV, 2001.
7. Johnston A., Holt D. W. Generic substitution for cyclosporine: what should we be looking for in new formulations? // Transplant Proc. — 1998. — Vol. 30, No. 5. — P. 1652–1653.
8. Kahan B. D. The impact of cyclosporine on the practice of renal transplantation // Transplant. Proc. — 1989. — Vol. 20, No. 3, Suppl. 1 (June). — P. 34S–40S.
9. Pharmacopoeia of the United States. The National Formulary. USP XXVII, 2004.

Поступила 14.10.2005.

УДК 615.277.3.038:615.453.6

*M. A. Baryshnikova<sup>1</sup>, O. L. Orlova<sup>1</sup>, Z. S. Shprakh<sup>1</sup>, E. M. Ukolova<sup>2</sup>, A. P. Polozkova<sup>1</sup>,  
S. A. Partolina<sup>1</sup>, L. N. Zhilova<sup>2</sup>, L. P. Yudina<sup>2</sup>, N. A. Oborotova<sup>1</sup>*

## DEVELOPMENT OF THE GALAVIT NEW PHARMACEUTICAL DOSAGE FORM AS SUBLINGUAL TABLETS

<sup>1</sup> N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

<sup>2</sup> Centre of Modern Medicine «Medicor», Moscow

### ABSTRACT

Galavit, an original Russian drug, belongs to synthetic immunotropic drugs. For convenience of Galavit application at the out of hospital patients the new pharmaceutical dosage form as a sublingual tablets has been created. The monograph project for the new pharmaceutical dosage form of Galavit has been developed. Technology allowing to obtain Galavit sublingual tablets meeting the requirements of monograph project has been carried out.

**Key words:** Galavit, sublingual tablets, technological characteristics.

*M. A. Барышникова<sup>1</sup>, О. Л. Орлова<sup>1</sup>, З. С. Шпрах<sup>1</sup>, Е. М. Уколова<sup>2</sup>, А. П. Полозкова<sup>1</sup>,  
С. А. Партолина<sup>1</sup>, Л. Н. Жилова<sup>2</sup>, Л. П. Юдина<sup>2</sup>, Н. А. Оборотова<sup>1</sup>*

## РАЗРАБОТКА НОВОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ГАЛАВИТА В ВИДЕ СУБЛИНГВАЛЬНЫХ ТАБЛЕТОК

<sup>1</sup> ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>2</sup> ЗАО Центр современной медицины «Медикор», Москва

### РЕЗЮМЕ

Галавит — оригинальный отечественный препарат, относящийся к группе иммунотропных лекарственных средств синтетического происхождения. Для удобства применения у больных в амбулаторных условиях создана новая лекарственная форма галавита в виде сублингвальных таблеток, на которую разработан проект Фармакопейной статьи предприятия (ФСП). Разработана технология, позволяющая получить стандартные серии таблеток, отвечающие требованиям ФСП.

**Ключевые слова:** галавит, сублингвальные таблетки, технологические характеристики.

### ВВЕДЕНИЕ

Галавит разработан группой ученых Московской медицинской академии им. И. М. Сеченова. Активное действующее вещество — 5-амино-1,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидрофталазин-2-ид натрия дигидрат. В 1997 г. галавит зарегистрирован в России и рекомендован к применению в виде сухой распылки для приготовления раствора для инъекций у взрослых в составе комплексной терапии для коррекции иммунодефицитных состояний [1; 4].

Разработка галавита и внедрение его в клиническую практику обусловлены постоянным ростом аллергических, аутоиммунных, инфекционно-воспалительных и онкологических заболеваний, а также отсутствием желаемого эффекта при проведении традиционной этиотропной терапии [5].

Показаниями к применению галавита как иммуномодулятора в комплексной терапии вторичных иммунодефицитных состояний являются:

— инфекционные заболевания различной этиологии (фурункулез, рожа, острые вирусные гепатиты, гнойные менингиты, остеомиелит и др.);

— острые кишечные инфекции, протекающие с интоксикацией и диареей (сальмонеллез, дизентерия, пищевая токсикоинфекция и др.);

— гнойно-септические процессы (для профилактики и лечения осложнений в до- и послеоперационном периоде);

— хронические заболевания желудочно-кишечного тракта (язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, хронические гепатиты различной этиологии);

— хронические заболевания мочеполовой системы (урогенитальный герпес, хламидиоз, микоплазмоз, уретрит, простатит, аденома предстательной железы, пиелит, пиелонефрит, сальпингит, вагинит, дисплазия шейки матки, миома) [1; 3].

Поскольку препарат обладает широким спектром показаний, было проведено исследование по созданию сублингвальной таблетированной лекарственной формы галавита для удобства применения в амбулаторных условиях.

Таблетки обладают рядом преимуществ перед другими лекарственными формами: удобство применения, точность дозирования, возможность регулирования всасывания лекарственных веществ из таблетки в месте растворения и во времени, возможность сочетания лекарственных веществ, не совместимых по физико-химическим свойствам и терапевтическому действию, возможность маскировать неприятный вкус и запах, производственные преимущества. Для достижения наиболее быстрой и полной биодоступности препарата предлагаются сублингвальные таблетки галавит.

Целью настоящего исследования явилось создание новой лекарственной формы галавита в виде таблеток для сублингвального применения и разработка проекта ФСП.

Для достижения поставленной цели в первую очередь необходимо было создать смесь для таблетирования, обладающую соответствующими технологическими характеристиками.

Технологические характеристики порошков определяют возможности использования конкретных видов прессования и необходимость введения в таблетлируемую смесь ингредиентов, ответственных как за характеристики смеси, обеспечивающие стабильность процесса таблетирования (текучесть, равномерность заполнения матрицы, адгезия к прессующему инструменту и др.), так и за качество получаемых таблеток (распадаемость, растворимость, твердость и др.). В связи с этим были изучены важнейшие характеристики веществ субстанции галавит, в т. ч. фракционный состав, форма и соотношение параметров размера частиц, объемные характеристики, сыпучесть или подвижность, прессуемость. Смачиваемость порошков изучается как характеристика, дающая представление о взаимодействии жидкости с поверхностью частиц порошка и способности проникновения воды в таблетку при ее дезинтеграции в водной среде, т. е. в конечном итоге — способности таблетки распадаться. В связи с очень хорошей растворимостью галавита в воде данная характеристика не изучалась. Объемные характеристики порошков дают информацию об их способности к сжатию под давлением, что служит ориентиром при выборе прессующего инструмента и таблеточных машин.

Контроль качества разрабатываемой лекарственной формы явился одним из основных составляющих компонентов системы ее создания. Для решения данной проблемы проведен прежде всего критический отбор критериев качества сублингвальных таблеток галавит и определены их основные параметры.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Субстанция галавит предоставлена изготовителем — ЗАО «Медикор» (Москва). При проведении ис-

следований были использованы вспомогательные вещества, соответствующие требованиям нормативной документации: ГФ X и XI изданий, отдельных Фармакопейных и Временных фармакопейных статей, ГОСТов и МРТУ.

Технологические характеристики исследованы на приборах фирмы Erweka (Германия) с применением стандартных методик. Насыпную массу определяли путем 20-кратного взвешивания массы субстанции галавит, свободно насыпанного в цилиндр вместимостью 10 мл. Исследование текучести и угла естественного откоса проводилось на приборе собственной конструкции, представляющим собой вибрирующую стеклянную воронку.

Для получения таблеток использовался лабораторный пресс фирмы Erweka (Германия).

Проект фармакопейной статьи предприятия на препарат «Галавит таблетки сублингвальные 25 мг» разрабатывался в соответствии с требованиями Отраслевого стандарта «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения» 91500.05.001-00 и требованиями ГФ XI, вып. 2 на образцах лекарственной формы, полученных согласно технологии, описанной в лабораторном регламенте.

Оценку качества препарата проводили по следующим основным показателям, характерным для контроля качества таблеток: описание (внешний вид), подлинность, средняя масса таблеток и отклонение в массе, распадаемость, посторонние примеси, количественное определение, однородность дозирования. Особенностью нормативных документов для контроля качества сублингвальных таблеток является отсутствие теста «Растворение».

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Исследование технологических характеристик субстанции галавит*

При исследовании фракционного состава оказалось, что галавит является полидисперсным. Фракция с размером частиц менее 0,25 мм — чуть более 50 %, фракция с размером частиц 0,25–0,5 мм — менее 50 %. Таким образом, фракционный состав субстанции галавит позволяет вводить в состав смесей для прессования более крупные частицы.

При исследовании линейных размеров и формы частиц галавита оказалось, что он имеет различную форму, размеры и шероховатость.

Характер поверхности порошков имеет определенное значение для прогнозирования прочности таблетки. Галавит имеет слабо шероховатую поверхность, глубина выступов и впадин находится в пределах  $1/2-1/3$  размера соответствующих частиц, благодаря чему он способен спрессовываться.

При исследовании текучести (сыпучести) оказалось, что по ряду причин, в т. ч. сильной электризуемости, субстанция галавит плохо и нестабильно высыпается из вибрирующей воронки. Поэтому можно говорить лишь о приблизительном значении коэффициента текучести. Для улучшения текучести

порошков необходимо увеличение фракции укрупненных и утяжеленных частиц, что может быть достигнуто гранулированием или же созданием смеси, содержащей более крупные и тяжелые частицы.

При исследовании насыпной массы субстанции галавит оказалось, что при свободном насыпании в цилиндр вместимостью 10 мл она составила 0,09 г/см<sup>3</sup>.

Приведенные технологические характеристики субстанции галавит хорошо иллюстрируют, что прямое прессование в данном случае было неприемлемым.

После введения в состав таблетки сорбита, крахмала и лактозы, а также влажной грануляции фракционный состав гранул для таблетирования стал равномерным (размеры частиц около 0,5 мм), насыпная масса составила 0,15 г/см<sup>3</sup>, а сыпучесть стала равномерной и составила 3,0 г/с, смесь не электризовалась (табл. 1).

Таблица 1.

#### Некоторые технологические характеристики субстанции галавит

Технологическая характеристика	Субстанция	Гранулы для таблетирования
Насыпная масса, г/см <sup>3</sup>	0,09	0,15
Сыпучесть, г/с	0,1	3,0

#### Выбор вспомогательных веществ

Особенностью выбора вспомогательных веществ для создания таблетированной лекарственной формы галавит для сублингвального применения являются ее органолептические свойства. Субстанция галавит обладает очень горьким вкусом. Поэтому кроме коррекции основных технологических характеристик субстанции необходимо было подобрать вспомогательные вещества для коррекции вкуса таблетки. При этом активное вещество должно всасываться в ротовой полости.

Так как галавит легко растворим в воде, в качестве гранулирующей жидкой фазы был выбран 95% этиловый спирт, а в качестве гранулирующего агента была предложена легко растворимая в 95% этиловом спирте ацетилфталилцеллюлоза. Для грануляции использовали растворы ацетилфталилцеллюлозы в концентрации 1 и 2 %.

Галавит — 0,05 г      Галавит — 0,05 г  
Сорбит — 0,55 г      Фруктоза — 0,55 г

Каждую смесь увлажняли 1 или 2% раствором ацетилфталилцеллюлозы в 95% этиловом спирте и сушили на воздухе в течение 1 ч (до высыхания). Затем смесь растирали в ступке и таблетировали.

Обе смеси хорошо спрессовались, но смеси, увлажненные 1% раствором ацетилфталилцеллюлозы, были недостаточно прочными. Поэтому в дальнейшей работе для грануляции использовали 2% раствор ацетилфталилцеллюлозы в 95% этиловом спирте.

Через сутки таблетки с фруктозой сильно набрали влагу (стали мокрыми). Так как фруктоза более сладкая, чем сорбит, для коррекции вкуса решили не отказываться

от данного вспомогательного вещества и изучили возможность использования различных смесей, содержащих сорбит и фруктозу в разных соотношениях.

При увеличении массы смеси для таблетирования она не высыхала на воздухе после грануляции. При подсушивании в сушильном шкафу при температуре +20 – +40 °С образовывалась карамель.

В дальнейшей работе от использования в качестве вспомогательного вещества фруктозы отказались и в качестве основного вспомогательного вещества использовали сорбит.

Для улучшения вкусовых качеств и внешнего вида в таблетки галавит в качестве дополнительного вспомогательного вещества ввели ментол и лактозу, а также уменьшили дозу галавита в 2 раза.

Во избежание залипания смеси для таблетирования на пуансоны при ее прессовании использовали опудривающую смесь следующего состава: крахмал — 0,03 г, стеарат кальция — 0,005 г, тальк — 0,015 г.

Полученные таблетки упаковывали в блистер по 10 штук.

Некоторые смеси для таблетирования приведены в табл. 2.

Таблица 2.

#### Некоторые смеси для таблетирования галавита

Модельные смеси для таблетирования	Результат
Галавит — 0,05 г Сорбит — 0,30 г Фруктоза — 0,35 г	Хорошо прессовались. Через сутки набрали влагу
Галавит — 0,05 г Сорбит — 0,35 г Фруктоза — 0,30 г	
Галавит — 0,05 г Сорбит — 0,40 г Фруктоза — 0,25 г	
Галавит — 0,05 г Сорбит — 0,55 г	Хорошо прессовались. Готовая таблетка крошилась и слоилась. Горький вкус
Галавит — 0,05 г Сорбит — 0,45 г Крахмал — 0,10 г	
Галавит — 0,05 г Сорбит — 0,40 г Крахмал — 0,15 г	
Галавит — 0,05 г Сорбит — 0,35 г Крахмал — 0,20 г	Хорошо прессовались. Таблетки по внешнему виду хорошего качества, без сколов, но шероховатая поверхность. Горький вкус
Галавит — 0,025 г Сорбит — 0,315 г Крахмал — 0,1 г Лактоза — 0,1 г	Хорошо прессовались. Таблетки по внешнему виду хорошего качества, без сколов, поверхность глянцевая. Горький вкус чувствуется гораздо меньше

#### Разработка Фармакопейной статьи предприятия

В процессе разработки ФСП исследовано два состава таблеток галавит:



I. Галавит (ФСП 42-0098-0227-00) — 0,025 г	II. Галавит (ФСП 42-0098-0227-00) — 0,025 г
Сорбит USP NF — 0,315 г	Сорбит USP NF — 0,315 г
Крахмал USP NF — 0,20 г	Крахмал USP NF — 0,1 г
Опудривающая смесь (крахмал, кальция стеарат, тальк, ментол) — 0,06 г	Лактоза USP NF — 0,1 г
	Опудривающая смесь (крахмал, кальция стеарат, тальк, ментол) — до получения таблетки массой 0,6 г

В проект ФСП включены разделы, характерные для контроля качества таблеток.

В разделе «Описание» изложены требования к внешнему виду таблеток. Все испытанные серии препарата представляли собой таблетки белого цвета с блестящими точечными вкраплениями. Диаметр таблеток  $12 \pm 2$  мм, однако нанесение риски не проводится, поскольку разделения таблетки при сублингвальном применении не предусмотрено.

Подлинность галавита в таблетках определяли методом тонкослойной хроматографии одновременно с определением посторонних примесей и методом УФ-спектрофотометрии одновременно с количественным определением. При определении подлинности методом хроматографии в тонких слоях сорбента (ТСХ) использовали готовые пластинки для ТСХ Kieselgel 60 F 254 (фирмы Merck, Германия). Система растворителей н-бутанол — 95% спирт этиловый — концентрированный раствор аммиака 3:1:1 подобрана экспериментально. При просмотре высушенной пластинки в УФ-свете при длине волны 254 и 365 нм активное вещество в пробе таблеток проявлялось в виде голубовато-зеленого пятна, соответствующего по положению и интенсивности окрашивания пробе стандартного вещества (субстанции галавит).

Электронный спектр поглощения профильтрованного через бумажный фильтр раствора таблеток галавит должен совпадать по положению и интенсивности полос в максимумах и минимумах поглощения со спектром раствора рабочего стандарта субстанции.

Определение средней массы таблеток проводили гравиметрически в соответствии с требованиями ГФ XI [2]. Средняя масса, определенная взвешиванием 20 таблеток, находилась в пределах 0,570–0,630 г, отклонение массы 18 из 20 таблеток удовлетворяло фармакопейным требованиям и не превышало пределов, определенных ГФ XI ( $\pm 5\%$ ).

Определение распадаемости таблеток проводили согласно требованиям ГФ XI, вып. 2. Таблетки всех испытанных серий препарата распались в воде без использования дисков в течение не более 15 мин.

Для оценки посторонних примесей в таблетках галавит использован метод хроматографии в тонких слоях сорбента на пластинках Kieselgel 60 F 254 фирмы Merck (Германия). Галавит из таблеток извлекали, взбалтывая растертый порошок с водой с последующим фильтрованием. На линию старта хроматографической пластинки наносили по 5 мкл фильтрата (50 мкг галавита), раствора стандартного образца вещества-свидетеля СОВС-1 (50 мкг субстанции галавит), раствора стандартного образца вещества-свидетеля СОВС-2 (0,1 мкг галавита) и раствора стандарт-

ного образца вещества-свидетеля СОВС-3 (0,01 мкг галавита). Хроматографировали восходящим способом в системе растворителей н-бутанол — 95% спирт этиловый — аммиак концентрированный 3:1:1. При проявлении УФ-светом при длинах волн 254 и 366 нм в пробе таблеток обнаруживали основное пятно галавита, по положению и интенсивности окрашивания соответствующее пятну стандартного образца вещества-свидетеля СОВС-1. В пробе таблеток также возможно появление дополнительных пятен выше и ниже основного, по интенсивности окрашивания не превышающих пятно пробы стандартного образца вещества-свидетеля СОВС-2 (не более 0,2% каждой индивидуальной примеси в препарате). Суммарное содержание примесей в препарате не должно превышать 1,0%.

Пригодность хроматографической системы оценивали по проявлению в УФ-свете пятна стандартного образца вещества-свидетеля СОВС-3 (0,01 мкг галавита).

Для количественного определения основного действующего вещества в препарате использован метод прямой спектрофотометрии с использованием раствора рабочего стандартного образца. В электронном спектре поглощения галавита наблюдается три характеристических полосы поглощения с максимумами при длине волн  $260 \pm 2$ ,  $297 \pm 2$  и  $347 \pm 2$  нм. Максимум при 297 нм имеет аналитическое значение и расположен в той части спектра, где не поглощают излучения вспомогательные вещества, использованные для получения таблеток галавит. Кроме того, как показала статистическая обработка полученных результатов, использование длины волны 297 нм позволяет получить наиболее воспроизводимые результаты. Специально проведенные исследования показали, что поглощение растворов лекарственной формы галавита подчиняется закону Бугера—Ламберта—Бера в диапазоне концентрации 0,01–0,05 мг/мл.

Во всех исследованных образцах лекарственной формы содержание галавита укладывалось в определенные ФСП пределы — от 22,5 до 27,5 мг/таблетка ( $25 \text{ мг} \pm 10\%$ ).

Предложенная методика спектрофотометрического определения галавита в таблетках достаточно чувствительна, обладает высокой точностью и воспроизводимостью, при этом ошибка определения среднего результата не превышает 2%.

Поскольку в сублингвальных таблетках галавит содержится менее 50 мг активного вещества, в соответствии с требованиями ГФ XI определяли однородность дозирования методом УФ-спектрофотометрии из отдельной таблетки. Отклонение содержания галавита в каждой таблетке не превышало  $\pm 15\%$ .

Срок годности препарата определяется при хранении при комнатной температуре ( $20 \pm 2$  °C).

Полученные серии таблеток отвечают требованиям стандартности и по изученным химико-фармацевтическим характеристикам очень близки между собой (табл. 3).

Таблица 3.

Результаты количественного определения галавита в таблетках ( $p=95\%$ ,  $t_{p,t}=2,57$ ,  $n=6$ )

Серия препарата	Оптическая плотность	Найдено галавита, мг/таблетка	Метрологические характеристики определения
010705	0,326	25,1	$\bar{x} = 25,08$ $S_x = 0,4070$ $S_{\bar{x}} = 0,1660$ $\Delta \bar{x} = 0,4268$ $\bar{\varepsilon} = 1,70\%$
	0,335	25,8	
	0,329	25,3	
	0,322	24,8	
	0,319	24,5	
	0,325	25,0	
020705	0,281	24,5	$\bar{x} = 24,70$ $S_x = 0,4050$ $S_{\bar{x}} = 0,1650$ $\Delta \bar{x} = 0,4251$ $\bar{\varepsilon} = 1,72\%$
	0,288	25,1	
	0,276	24,1	
	0,292	25,4	
	0,279	24,3	
	0,285	24,8	
011205	0,325	25,5	$\bar{x} = 25,72$ $S_x = 0,4401$ $S_{\bar{x}} = 0,1797$ $\Delta \bar{x} = 0,4619$ $\bar{\varepsilon} = 1,80\%$
	0,335	26,3	
	0,328	25,8	
	0,320	25,1	
	0,325	25,5	
	0,332	26,1	

## ВЫВОДЫ

1. Исследованы технологические характеристики субстанции галавит. Показано, что прямое прессование порошка галавит неприемлемо.

2. Выбраны вспомогательные вещества для получения сублингвальной таблетированной лекарственной формы галавита. Для грануляции смеси галавит со вспомогательными веществами предложен 2% раствор ацетилфталилцеллюлозы в 95% спирте этиловом.

3. Разработана технология получения таблеток галавит для сублингвального применения.

4. Разработан проект ФСП на сублингвальные таблетки галавит.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Галавит в эксперименте и клинике / Под ред. М. Т. Абидова. — М., 1999. — 60 с.

2. ГФ XI, вып. 2. — М.: Медицина, 1990. — С. 154.

3. *Добрица В. П., Ботерашвили Н. М., Добрица Е. В.* Современные иммуномодуляторы для клинического применения / Руководство для врачей. — СПб.: Политехника. — С. 164–165.

4. *Коробкова Л. И., Вельшер Л. З., Германов А. Б. и др.* Роль иммуномодулятора Галавит в онкологической и хирургической практике // Рос. биотер. журн. — 2004. — Т. 3, № 3. — С. 87–92.

5. *Хаитов Р. М., Пинегин Б. В.* Вторичные иммунодефициты: клиника, диагностика, лечение // Иммунология. — 1999. — № 2. — С. 14–17.

Поступила 23.01.2006.

УДК 591.883:615.37:616-022.1

N. K. Ahmatova<sup>1</sup>, M. V. Kiselevsky<sup>2</sup>, E. A. Kurbatova<sup>1</sup>, A. I. Makashin<sup>1</sup>, B. F. Semenov<sup>1</sup>

## PROTECTIVE EFFECT OF DENDRITIC CELLS IN MICE INFECTED OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

<sup>1</sup> I. I. Mechnikov Institute of Vaccine and Serum RAMS, Moscow<sup>2</sup> N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

### ABSTRACT

The purpose of the present work was the studying of protective activity of dendritic cells (DC) against *Klebsiella pneumoniae* (K2) infection in mice. Mature DC were generated from mouse bone marrow cells. LPS of *K. pneumoniae*, lysat of *K. pneumoniae* K<sub>2</sub> and polycomponental vaccine VP-4 (sum of bacterial antigens) were used as inducers of DC maturation. Intraperitoneal introduction of immature and mature DC into mice led to protective effect in 83,3–100 % animals infected by *K. pneumoniae* K<sub>2</sub> (150 LD<sub>50</sub>). Protective effects did not depend on character of the stimulating agents.

Mature DC, probably, can upregulate immune responses by promoting the secretion of Th1 regulatory cytokines. Protective activity of immature DC may be connected with the subsequent induction of cytokines synthesis resulting from their maturation by the bacterial factors *in vivo*.

Creation of DC-vaccines for adoptive immunotherapy may be perspective in prevention and therapy of infectious diseases.

**Key words:** dendritic cells, TNF- $\alpha$ , *K. pneumoniae*, Immunovac-VP-4, LPS, immunophenotype.

Н. К. Ахматова<sup>1</sup>, М. В. Киселевский<sup>2</sup>, Е. А. Курбатова<sup>1</sup>, А. И. Макашин<sup>1</sup>, Б. Ф. Семенов<sup>1</sup>

## ПРОТЕКТИВНЫЙ ЭФФЕКТ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЗАРАЖЕНИИ МЫШЕЙ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

<sup>1</sup>ГУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва<sup>2</sup>ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

### РЕЗЮМЕ

Цель настоящей работы — изучение протективной активности дендритных клеток (ДК) при заражении мышей линии СВА культурой штамма *K. pneumoniae* K<sub>2</sub>. В качестве индукторов созревания дендритных клеток, генерированных из костного мозга мышей, использованы липополисахарид *K. pneumoniae*, лизат штамма *K. pneumoniae* K<sub>2</sub> и поликомпонентная вакцина Иммуновак-ВП-4 из антигенов условно-патогенных микроорганизмов. Незрелые ДК, так же как и зрелые, независимо от характера стимулирующего агента при внутрибрюшинном введении мышам оказывали протективное действие от 83,3 до 100 % при заражении *K. pneumoniae* (150 ЛД<sub>50</sub>).

ДК синтезируют целый набор цитокинов, что, возможно, способствует активации сложных механизмов межклеточных взаимодействий. Протективная активность незрелых ДК по отношению к заражению *K. pneumoniae*, возможно, связана с последующей индукцией синтеза цитокинов *in vivo* под воздействием ДК и микробных клеток. Полученные результаты позволяют сделать выводы о том, что ДК обладают высокой способностью стимулировать пролиферацию сингенных МЛ, что, вероятно, связано с участием ДК в реакциях межклеточного взаимодействия при формировании неспецифического иммунного ответа.

Создание вакцин на основе ДК для адоптивной иммунотерапии может быть перспективным в профилактике и терапии инфекционных заболеваний.

**Ключевые слова:** дендритные клетки, TNF- $\alpha$ , Иммуновак-ВП-4, липополисахарид *K. pneumoniae*, иммунофенотип.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время перспективным направлением в экспериментальной и практической медицине является адоптивная иммунотерапия. В основе ее лежит

применение естественных для организма веществ или активация естественных механизмов иммунной защиты. Исследования последних лет выявили эффективность методов адоптивной иммунотерапии в биотерапии опухолей [1; 2; 4; 18; 23] и лечении инфекционных

заболеваний [21]. Дендритные клетки, пульсированные *ex vivo* различными белковыми антигенами, способны праймировать наивные Т-лимфоциты *in vivo* и индуцировать протективный иммунитет против различных опухолевых антигенов и бактериальных инфекций [14; 20; 22]. Использование ДК, обработанных антигеном, оказалось весьма эффективным для индукции антибактериального протективного иммунитета против внутриклеточных патогенов (*Leishmania donovani* и *Mycobacterium tuberculosis*), где Th1-клеточный доминантный ответ наиболее важен в регуляции инфекционного процесса [12; 16]. У лабораторных животных, зараженных *Bordetella pertussis*, ДК усиливают специфический иммунный ответ, характеризующийся синтезом иммуноглобулинов IgG и IgA в легких [13; 24].

Дендритные клетки представляют собой профессиональные антигенпредставляющие клетки (АПК), обладающие уникальной способностью индуцировать первичный иммунный ответ [5; 8; 9; 11]. ДК могут праймировать наивные Т-клетки и ЦТЛ, а также активировать клетки памяти. Кроме того, ДК способны активировать NK и NKT-клетки и индуцировать дифференцировку В-клеток в IgM-продуцирующие клетки [10; 15].

В настоящее время глобальный характер приобретает неуклонное повышение резистентности как патогенных, так и условно-патогенных микроорганизмов к антибактериальным препаратам. В связи с этим особый интерес представляет разработка иммунотерапии оппортунистических и условно-патогенных инфекций, к которым относится *K. pneumoniae*.

**Цель исследования** — изучение протективной активности ДК при заражении мышей линии СВА культурой штамма *K. pneumoniae K<sub>2</sub>*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для получения дендритных клеток (ДК) использованы клетки костного мозга 30 мышей линии СВА. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

### Культивирование ДК

ДК получали из клеток костного мозга мышей линии СВА. Костный мозг мышей гомогенизировали в среде RPMI-1640 (Sigma, США), трижды осаждали центрифугированием (по 250 g в течение 5 мин) и переводили в обогащенную среду культивирования (106 клеток в 1 мл среды RPMI-1640 с добавлением 100 мкг/мл гентамицина сульфата и 10% термоактивированной эмбриональной телячьей сыворотки), содержащую 80 нг/мл рекомбинантных GM-CSF и 20 нг/мл IL-4 (Biosource, США).

На 6-е сутки инкубации при температуре 37 °C в атмосфере 4% CO<sub>2</sub> производили смену среды с добавлением лизата штамма *K. pneumoniae K<sub>2</sub>* (50 мкл/мл), или липополисахарида (ЛПС) *K. pneumoniae* (0,125 мг/мл) (Sigma, США), или поликомпонентной вакцины ВП-4 (50 мкг/мл) для индукции созревания ДК. Че-

рез 3 сут ДК отмывали от среды культивирования и вводили мышам.

### Выделение мононуклеарных лейкоцитов (МЛ)

Селезенки мышей гомогенизировали в среде 199 (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, Москва) и трижды осаждали центрифугированием. Взвесь спленоцитов центрифугировали при 400 g в течение 30 мин в градиенте плотности фиколл-урографина (Pharmacia, плотностью 1,077 г/см<sup>3</sup>); МЛ, образовавшие интерфазное кольцо, собирали пипеткой и 3-кратно отмывали средой 199. После каждой отмывки в 10-кратном объеме среды клетки осаждали центрифугированием при 200 g.

Для получения лимфоцитов взвесь МЛ в среде RPMI-1640 разливали во флаконы и не прилипшие клетки переводили в среду культивирования (106 клеток в 1 мл обогащенной среды RPMI-1640).

Мышам суспензию ДК (1,5–3,0г/106) вводили внутрибрюшинно в левую область по 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида. Затем сразу внутрибрюшинно вводили *K. pneumoniae K<sub>2</sub>* в правую область — 500 клеток (150 ЛД<sub>50</sub>) в 0,5 мл изотонического раствора.

### Препараты

В работе использовали липополисахарид (ЛПС) *K. pneumoniae* (0,125 мг/мл) (Sigma), лизат штамма *K. pneumoniae K<sub>2</sub>* (10<sup>7</sup> клеток/мл) и поликомпонентную вакцину Иммуновак-ВП-4 из антигенов условно-патогенных микроорганизмов (ГУ НИИВС им. И. И. Мечникова РАМН), содержащую ЛПС, ассоциированный с белком наружной мембраны грамотрицательных микроорганизмов, пептидогликан, тейхоевые кислоты и лабильные белковые компоненты стафилококка поликомпонентной вакцины ВП-4 (50 мкг/мл). Для сравнения степени зрелости ДК использовали коммерческий TNF-α (Biosours, США).

### Получение лизата микробных клеток *K. pneumoniae K<sub>2</sub>*

Микробную культуру обрабатывали воздействием импульсного ультрафиолетового излучения на установке «Альфа-1» в течение 15 мин. Затем культуру разводили до концентрации 10<sup>7</sup>/мл и двукратно подвергали процедуре замораживания и оттаивания. Полноту инактивации контролировали путем посева на чашки с питательным агаром. Лизат пропускали через фильтр (*d*=0,25) и 50 мкл/мл вводили в среду, содержащую ДК.

### Анализ фенотипа ДК

Фенотип ДК исследовали с использованием моноклональных антител (Caltag Laboratories, США) против соответствующих антигенов. Клетки отмывали холодным фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и окрашивали FITC (флюоресцеинизотиоционат) и мечеными PE (фикоэритрин) антителами согласно инструкции производителя. Затем отмывали 2 раза холодным ФСБ. Результаты учитывали на проточном цитометре FacsCalibur (Becton Dickinson, США). На ДК, полученных из клеток костного мозга мышей, исследовались уровни экспрессии молекул F4/80, CD34, CD38, CD40, CD80, CD86, MHC I и MHC II. Гейт (окно) популяции

клеток устанавливали на основе комбинации прямого и бокового светорассеяния и размера клеток. При учете результатов подсчитывали 10 000 клеток в гейте. Статистическая обработка материала проведена при помощи программного пакета WINMDI 2.8.

#### Определение уровня цитокинов

Уровень цитокинов определяли иммуноферментным методом с использованием тест-систем фирмы Biosource, США.

#### Оценка фагоцитарной активности ДК

Фагоцитарную активность ДК оценивали по поглощательной способности в отношении латексных частиц диаметром 2,7 мкм (ДИАЭМ, Москва). Определяли фагоцитарный индекс (ФИ) — процент клеток, вступивших в фагоцитоз, и фагоцитарное число (ФЧ) — среднее число бактерий, находящихся внутриклеточно (частное от деления общего числа поглощенных бактерий на число клеток, вступивших в фагоцитоз). Оба показателя рассчитывали в мазках, сделанных после 30- и 90-минутной инкубации, т. е. в общей сложности 120-минутной инкубации.

#### Оценка пролиферативной активности МЛ под воздействием ДК мышей

Прролиферативную активность МЛ, полученных из селезенки, оценивали с помощью колориметрического теста с витальным красителем AlamarBlue (Biosours, USA) в стерильных условиях, используя ламинарный бокс с горизонтальным потоком воздуха (Juan VFS 906). Суспензию ДК в обогащенной среде RPMI-1640 вносили в 96-луночные планшеты в количестве  $10 \times 10^3$  клеток на 1 лунку. Затем в эти же лунки добавляли взвесь сингенных МЛ в количестве  $200 \times 10^3$  клеток на 1 лунку и смешанные культуры инкубировали в течение 4 сут в стандартных условиях культивирования. По окончании инкубации в лунки вносили краситель AlamarBlue (10%). Флюоресценцию измеряли после 4-часовой инкубации при температуре 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> на флюориметре Versa Fluor V13 (Vtotal) при длине волны возбуждения 530–560 нм, эмиссии 590 нм и выражали в условных единицах (у. е.) флюоресценции. Рас-

считывали индекс стимуляции (ИС), представляющий собой отношение пролиферативной активности МНК при стимуляции зрелыми ДК и пролиферативной активности МНК при стимуляции незрелыми ДК.

Статистическую обработку данных проводили при использовании t-критерия Стьюдента с помощью стандартного пакета статистических программ Windows 98 (StatSoft 5.5).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате инкубации клеток костного мозга с GM-CSF и IL-4 были получены дендритные клетки, обладающие фенотипическими признаками незрелости (F4/80high, CD80low, CD86low) (табл. 1). Использование лизата штамма *K. pneumoniae* K2, ЛПС *K. pneumoniae*, вакцины ВП-4 и TNF-а в качестве индукторов созревания позволило получить зрелые ДК, характеризующиеся типичной морфологией и фенотипом CD34<sup>-</sup>, CD38high, CD40, CD80high, CD86high, МНС Ihigh, МНС IIhigh, F4/80low (рис. 1). Наличие на мембране ДК, стимулированных исследуемыми бактериальными препаратами, макрофагального маркера F4/80 (рецептора к ЛПС) связано с присутствием в них бактериальных ЛПС. Эти результаты подтверждаются полученными ранее данными о способности ДК, обработанных ЛПС, экспрессировать не только антигены зрелых ДК, но и рецепторы к ЛПС [7]. Согласно полученным данным, все исследуемые препараты стимулировали созревание ДК. Данные клетки экспрессировали на своей поверхности костимулирующие молекулы (CD40, CD80, CD86) и молекулы МНС I и II класса, при этом наиболее (почти в 8 раз по сравнению с незрелыми ДК) повышалась экспрессия маркера CD80.

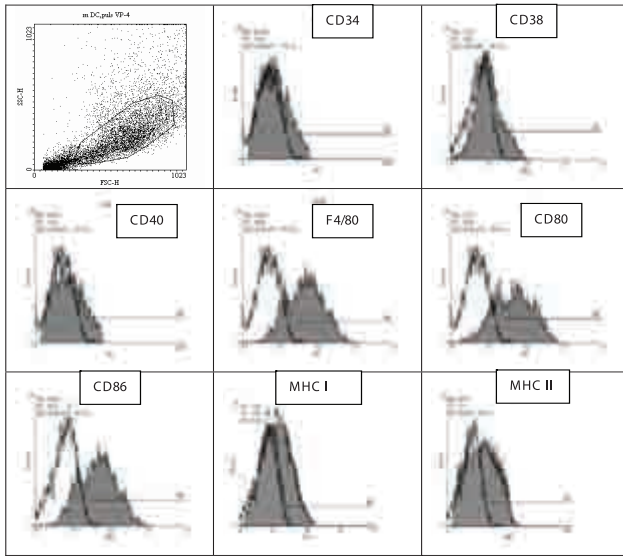
По своим морфологическим характеристикам, как было показано при фазово-контрастной микроскопии, клетки, полученные при этих условиях, имели звездчатую или вуалевидную форму с характерными цитоплазматическими отростками, что соответствует описанию ДК другими исследователями [19].

Таблица 1.

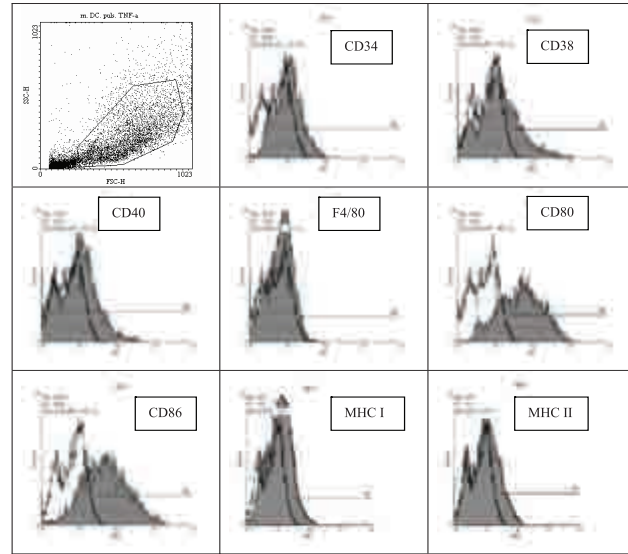
**Влияние препаратов — индукторов созревания ДК, генерированных из клеток костного мозга мышей (n=15), на уровень экспрессии поверхностных молекул**

Группа	Концентрация компонентов в среде культивирования ДК				Уровень экспрессии поверхностных молекул, %								
	Лизат, мкл/мл	ЛПС, мкг/мл	ВП-4, мкг/мл	TNF-α, нг/мл	CD34	CD38	CD40	CD80	CD86	МНС I	МНС II	F4/80	
1	0	0	0	0	15,9±1,2	5,0±0,1	0,5±0,1	8,1±0,4	5,3±0,4	9,3±2,3	9,1±2,1	58,9±2,2	
2	0	0	0	20	6,9±3,5	22,6±2,7*	23,2±3,4*	65,9±0,9*	61,2±2,8*	31,0±4,5*	32,3±4,2*	4,6±0,7**	
3	0	0	50	0	5,8±2,3*	13,5±1,2*	36,8±2,3*	66,3±0,8*	30,3±3,5*	18,1±3,8*	18,3±3,4*	36,5±2,5	
4	0	0,125	0	0	6,2±1,5*	10,8±1,7*	10,6±3,5*	64,3±1,5*	59,1±8,5*	22,1±4,7*	17,5±2,5*	45,3±7,7	
5	50	0	0	0	6,2±2,3*	12,3±1,2*	10,2±2,8*	63,1±1,6*	48,4±5,2*	21,6±0,7	14,7±0,8*	32,1±5,1	
6	Исходный фенотип клеток костного мозга				28,2±3,7	0,3±1,5	0,3±0,1	0	0	0	0	0,5±0,1	

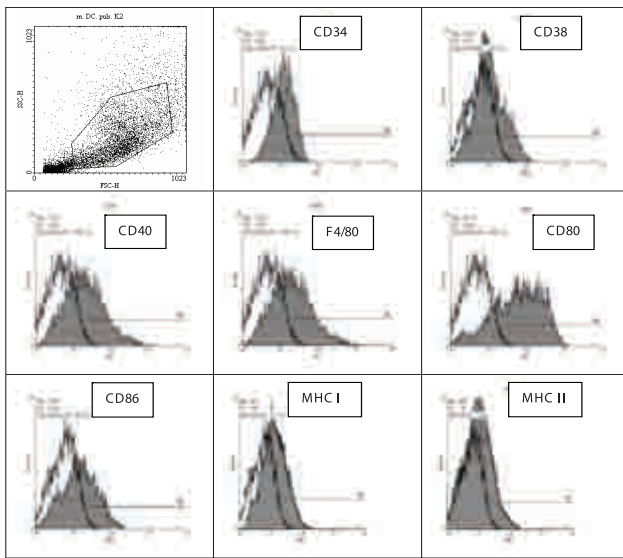
\* Достоверность различий между группами p1 и p2,3,4,5 <0,05.



**А**



**В**



**Б**

**Рис. 1.** Гистограммы, отражающие экспрессию поверхностных молекул (кластеров детерминации) зрелых ДК, полученных с использованием:

**а** — Иммуновак-ВП-4 (50 нг/мл); **б** — ЛПС *K. pneumoniae* (0,125 мг/мл); **в** — рекомбинантного TNF-а (20 нг/мл); верхний ряд, дот-плот — светорассеяние (популяция зрелых ДК в очерченной области); левый пик — аутофлуоресценция клеток при использовании изотипического контроля; правый пик — флуоресценция (FITC — флуоресцинизиотионат и R-PE фикоэритрин) после окрашивания соответствующими антителами; по оси ординат — количество клеток; по оси абсцисс — интенсивность флуоресценции; CD — дифференцировочные антигены; MHC I, II — молекулы главного комплекса гистосовместимости I и II класса

ДК обладали фагоцитарной активностью в отношении различных условно-патогенных микроорганизмов и фагоцитировали частицы латекса. ФИ30 незрелых ДК составил 95,12±1,56 %, ФЧ30 — 15,31±1,2 %, причем способность к фагоцитозу снижалась по мере созревания. У пульсированных ДК ФИ120 составил 44,3±2,5 %, ФЧ120 — 6,7±0,88 % (p<0,05).

В культуральной среде со зрелыми ДК достоверно повышался уровень ряда цитокинов (IL-1b, IL-6, IL-12, INF-g и TNF-a) по сравнению с незрелыми ДК, при

этом наиболее высокими были концентрации IL-6 (566,2±10,3 пг/мл), IL-12 (152,1±7,2 пг/мл), TNF-a (733,2±12,8 пг/мл) и INF-g (159,8±6,4 пг/мл) (табл. 2). Содержание IL-2, IL-10 не претерпевало существенных изменений, в то время как продукция IL-4 зрелыми ДК была достоверно ниже, чем у незрелых форм.

Изучение пролиферативной активности МЛ, полученных из предшественников костного мозга мышей, выявило способность ДК усиливать бласттрансформацию сингенных МНК (табл. 3). Спонтанная пролифера-

Таблица 2.

**Индукция цитокинов дендритными клетками**

ДК	IL-1β	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-12	TNF-α	INF-γ
Незрелые	1,03±0,05	13,6±1,5	44,9±5,3	90,9±4,8	101,4±5,9	5,0±0,03	77,2±5,6	18,42±2,1
Зрелые	26,6±1,7**	13,6±1,7	19,1±1,8*	566,2±10,3**	109,6±6,2	152,1±7,2**	733,2±12,8**	159,8±6,4**

Достоверность различий: \* p < 0,05, \*\* p < 0,001.

Таблица 3.

## Способность зрелых дендритных клеток стимулировать пролиферацию сингенных МНК

Группа	Концентрация компонентов в среде культивирования						Пролиферативная активность МНК, у. е.	
	МНК	ДК	Индукторы созревания ДК				Оптическая плотность	ИС
			ВП-4, мкг/мл	Лизат, мкл/мл	ЛПС, мкг/мл	TNF- $\alpha$ , нг/мл		
1-я	10 <sup>6</sup>	0	0	0	0	0	0,650±0,073	—
2-я	10 <sup>6</sup>	5 x 10 <sup>4</sup>	0	0	0	0	0,666±0,054	—
3-я	10 <sup>6</sup>	5 x 10 <sup>4</sup>	0	0	0	100	1,458±0,074*	2,2
4-я	10 <sup>6</sup>	5 x 10 <sup>4</sup>	50	0	0	0	1,592±0,080*	2,3
5-я	10 <sup>6</sup>	5 x 10 <sup>4</sup>	0	50	0	0	1,564±0,090*	2,3
6-я	10 <sup>6</sup>	5 x 10 <sup>4</sup>	0	0	0,125	0	1,348±0,033*	2,0

Примечание: ИС (индекс стимуляции) — отношение пролиферативной активности МНК при стимуляции зрелыми ДК и пролиферативной активности МНК при стимуляции незрелыми ДК (2-я группа).

Достоверность различий между группами: \*p2 и p3,4,5,6 < 0,05.

тивная активность МЛ в условиях данного опыта составляла 0,650±0,073 у. е. (1-я группа). При культивировании МЛ в присутствии зрелых ДК, пульсированных бактериальными препаратами и TNF- $\alpha$ , отмечалось повышение пролиферативной активности мононуклеаров (p<0,05), причем все исследуемые препараты усиливали активность ДК практически в равной степени. Присутствие незрелых ДК не оказывало заметного влияния на пролиферацию МЛ.

При внутрибрюшинном введении ДК мышам, зараженным штаммом *K. pneumoniae* K<sub>2</sub> (150 ЛД<sub>50</sub>) отмечалось выраженное протективное действие от 83,3 до 100 % (табл. 4). Защитный эффект наблюдался как при воздействии зрелых ДК, обработанных липополисахаридом, лизатом *K. pneumoniae* или вакциной ВП-4, так и при действии неппульсированных (незрелых) ДК.

Зрелые ДК обладают рядом особенностей, позволяющих им максимально эффективно по сравнению с

незрелыми формами представлять антиген [5; 8]. Только зрелые ДК экспрессируют высокий уровень коstimулирующих молекул, обеспечивающих формирование вспомогательных сигналов при активации лимфоцитов, и высокий уровень молекул МНС I и МНС II, обеспечивающих эффективное представление антигена [13]. Таким образом, результаты наших исследований согласуются с данными ряда авторов [11; 12].

Высокий уровень фагоцитарной активности дендритных клеток (особенно незрелых) позволяет говорить о возможности их использования в создании ДК-вакцин для биотерапии инфекционных заболеваний [14; 24].

Значимое повышение содержания IL-6, IL-12 и TNF- $\alpha$  в культуре зрелых ДК, генерированных из предшественников костного мозга мышей и обработанных исследуемыми препаратами, свидетельствует о значении ДК в активации клеток иммунной системы. IL-6 является мощным фактором дифференцировки В- и Т-лимфоцитов, в особенности главным индуктором конечного этапа созревания В-клеток и макрофагов, а также цитотоксических лимфоцитов [3].

Повышение концентрации IL-12 в культуральной среде генерированных клеток индуцирует образование INF- $\gamma$  в Т-лимфоцитах, который, в свою очередь, влияет на приобретение Т-лимфоцитами свойств Th1-типа [5]. Таким образом, ключевая роль IL-12 связана с направлением дифференцировки предшественников в Th1-клетки, стимуляцией дифференцировки наивных CD8<sup>+</sup> Т-клеток в функционально-активные цитотоксические Т-клетки, а также усилением цитолитической активности NK-клеток и их пролиферации. ДК синтезируют целый набор цитокинов, что способствует активации сложных механизмов межклеточных взаимодействий. Очевидно, что эти механизмы обеспечивают выраженное противоиnфекционное действие зрелых

Таблица 4.

Неспецифическая протективная активность ДК мышей, генерированных из костного мозга при заражении мышей штаммом *K. pneumoniae* K<sub>2</sub> в дозе 150 LD<sub>50</sub> (n=12)

Группа	Индуктор, используемый для созревания ДК	Количество выживших мышей, % (M±m)
1-я	Лизат штамма <i>K. pneumoniae</i> K <sub>16</sub>	100,0
2-я	Лизат штамма <i>K. pneumoniae</i> K <sub>2</sub>	83,3±15,2
3-я	ЛПС <i>K. pneumoniae</i>	100,0
4-я	ВП-4	100,0
5-я	Контроль (незрелые ДК)	100,0

ДК независимо от использованного индуктора созревания. Отсутствие достоверных различий, очевидно, обусловлено тем, что все использованные агенты (ЛПС, поликомпонентная вакцина ВП-4 и лизат *K. pneumoniae*) содержат в своем составе в качестве фактора созревания липополисахарид.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаруженная в настоящей работе протективная активность незрелых ДК при их одновременном внутрибрюшинном введении с летальной дозой *K. pneumoniae*, очевидно, связана со способностью незрелых ДК активно фагоцитировать микробные клетки и усиливать механизмы врожденного иммунитета через TLR (Toll Like Receptors), в частности вызывать активацию макрофагов и NK. Кроме того, возможна индукция синтеза цитокинов ДК под воздействием ЛПС и микробных клеток *in vivo*. Известно, что патогены могут манипулировать ДК. Например, связывание *M. tuberculosis* с ДК приводит к инактивации последних. Отсутствие действенной лизосомной системы у ДК позволяет *P. gingivalis* существовать в их предшественниках (CD4<sup>+</sup>-клетках) более суток, в то время как моноцитам достаточно 60 мин для разрушения этого патогена [5]. Весьма вероятно, что в данных условиях ЛПС *K. pneumoniae* вызывал созревание ДК.

В предыдущих исследованиях [8; 13; 16; 24] ДК, пульсированные бактериальными антигенами, применялись в режиме профилактических вакцинаций (не менее чем за 2 нед. до заражения экспериментальных животных) с целью формирования специфического иммунного ответа. В настоящей работе показано, что ДК могут оказывать протективный эффект на фоне инфекционного процесса, при этом, очевидно, происходит активация преимущественно врожденного иммунитета.

Таким образом, адаптивная иммунотерапия с использованием ДК может быть перспективна направлением в профилактике и терапии инфекционных заболеваний.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Барышников А. Ю. Взаимоотношение опухоли и иммунной системы организма // *Практ. онкол.* — 2003. — Т. 4, № 3. — С. 127–129.
2. Давыдов М. И., Нормантович В. А., Киселевский М. В. и др. Адаптивная иммунотерапия при опухолевых плевритах: клинико-лабораторное исследование // *Рос. онкол. журн.* — 2000. — № 6. — С. 14–17.
3. Ковальчук Л. В., Ганковская Л. В., Хорева М. В., Соколова Е. В. Система цитокинов, комплемента и современные методы иммунного анализа. — М.: Рос. гос. мед. ун-т, 2001. — С. 120.
4. Кузнецова А. В., Данилова Т. И., Гладских О. П. и др. Дендритные клетки и их использование в иммунотерапии // *Молек. мед.* — 2003. — № 3. — С. 3–17.
5. Пальцев М. А. Введение в молекулярную медицину. — М.: Медицина, 2004. — 496 с.
6. Паценков М. В., Пинегин Б. В. Основные свойства дендритных клеток // *Иммунология.* — 2001. — С. 7–6.
7. Чикилева И. О., Халтурина Е. О., Киселевский М. В. Современные подходы и направления в иммунотерапии и иммунопрофилактике злокачественных новообразований // *Молек. мед.* — 2003. — № 2. — С. 40–50.
8. Ahuja S., Reddick R., Sato N. et al. Dendritic Cell (DC)-Based Anti-Infective Strategies: DCs Engineered to Secrete IL-12 Are a Potent Vaccine in a Murine Model of an Intracellular Infection // *J. Immunol.* — 1999 — Vol. 163. — P. 3890–3897.
9. Ardavin C., Martinez del Hoyo G., Martin P. et al. Origin and differentiation of dendritic cells // *Trends Immunol.* — 2001. — Vol. 22. — P. 691–700.
10. Blankenstein T., Schuler T. Cross-priming versus cross-tolerance: are two signals enough? // *Trends Immunol.* — 2002. — Vol. 23. — P. 171–173.
11. Cho B. K. A proposed mechanism for the induction of cytotoxic T-lymphocyte production by heat shock fusion proteins // *Immunity.* — 2000. — Vol. 12. — P. 263–272.
12. Fiorentino D., Zlotnik A., Vieira P. et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1-cells // *J. Immunol.* — 1991 — Vol. 146. — P. 34–44.
13. George-Chandy A., Mielcarek N., Nordstrom I. et al. Vaccination with Bordetella pertussis-Pulsed Autologous or Heterologous Dendritic Cells Induces a Mucosal Antibody Response In vivo and Protects against Infection // *Infect. Immun.* — 2001. — Vol. 69, No. 6. — P. 4120–4124.
14. Gilboa E., Nair S., Lyerly H. Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines // *Cancer Immunol. Immunother.* — 1998. — Vol. 46. — P. 82–85.
15. Granucci F., Andrews D. M., Degli-Esposti M., Ricciardi-Castagnoli P. IL-2 mediates adjuvant effect of dendritic cells // *Trends Immunol.* — 2002. — Vol. 23. — P. 169–171.
16. Johansson M., Schon K., Ward M., Lycke N. Genital tract infection with Chlamydia trachomatis fails to induce protective immunity in g-interferon receptor-deficient mice despite a strong local immunoglobulin A response // *Infect. Immun.* — 1997. — Vol. 65. — P. 10–32.
17. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия/ — М.: Мир, 1969. — С. 128–131.
18. Liu X., Li D., Zhang C., Ba D. et al. Treatment of 121 patients with malignant effusion due to advanced lung cancer by intrapleural transfer of autologous or allogenic LAK cells combined with RIL-2 // *Med. Sci. J.* — 1993. — Vol. 8. — P. 186–189.
19. Lotze M. T., Thomson A. W. Dendritic cells. Biology and clinical applications, 1999. — P. 14–237.
20. Priebe G. P., Meluleni G. J., Coleman F. T. et al. Protection against Fatal Pseudomonas aeruginosa Pneumonia in Mice after Nasal Immunization with a Live, Attenuated *aroA* Deletion Mutant // *Infect. Immun.* — 2003. — Vol. 7. — P. 22–25.



21. *Simpson E.* Immunotherapy and gene therapy // *E. Drugs.* — 2004. — Vol. 7(2). — P. 105–108.
22. *Su H., Messer R., Whitmire W. et al.* Vaccination against chlamydial genital tract infection after immunization with dendritic cells pulsed ex vivo with nonviable chlamydiae // *J. Exp. Med.* — 1998. — Vol. 188. — P. 809–816.
23. *Wan T., Zhou X., Chen G. et al.* Novel heat shock protein Hsp70L1 activates dendritic cells and acts as a Th1 polarizing adjuvant // *Blood.* — 2004. — Vol. 103(5). — P. 1747–1754.
24. *Worgall S., Kikuchi T., Singh R. et al.* Protection against Pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* following immunization with *P. aeruginosa*-pulsed dendritic cells // *Infect. Immun.* — 2001. — Vol. 69, No. 7. — P. 4521–4527.

Поступила 06.09.2005.

УДК 582.28:616-006.66-02:616-092.9

*V. P. Deryagina<sup>1</sup>, N. I. Ryzhova<sup>1</sup>, A. N. Razin<sup>2</sup>, I. A. Philippova<sup>2</sup>, M. Yu. Volkov<sup>2</sup>,  
O. A. Bocharova<sup>1</sup>*

## **EFFECT OF FUNGI *LENTINUS EDODES* ON GROWTH INOCULATED EHRlich ADENOCARCINOMA IN MICE**

<sup>1</sup> *N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow*

<sup>2</sup> *Shiitake Ltd., St. Petersburg*

### **ABSTRACT**

Effect of water suspension of fungi (WSF) *Lentinus edodes* on growth inoculated Ehrlich adenocarcinoma (ACE) was investigated in mice C57Bl and F1(C57BlxСВА). It was shown, that per os administration of WSF (188 and 376 mg/l) leads to the growth inhibition ACE (to 42; 50 and 53 %, volume) in mice C57Bl and F1(C57BlxСВА) and to 26,2 % (mass) in mice F1. Administration of WSF to healthy mice in dose 188 mg/l increased in 4,9 times total cells number of abdominal cavity basically due to increasing the lymphocytes number. When mice with ACE were given WSF (188 and 376 mg/l), total number of cells in abdominal cavity decreased in 4,7 times and was close to the index of control mice without tumors. WSF administrated to mice with tumors stimulated functional activity of abdominal cavity macrophages which was defined by formation of oxygen and nitrogen oxide active forms.

**Key words:** Ehrlich adenocarcinoma, *Lentinus edodes* fungi, tumor growth inhibition, macrophages, active forms of oxygen, nitrites, nitrates.

*В. П. Дерягина<sup>1</sup>, Н. И. Рыжова<sup>1</sup>, А. Н. Разин<sup>2</sup>, И. А. Филиппова<sup>2</sup>, М. Ю. Волков<sup>2</sup>,  
О. А. Бочарова<sup>1</sup>*

## **ДЕЙСТВИЕ ГРИБОВ *LENTINUS EDODES* (ШИИТАКЕ) НА РОСТ ПОДКОЖНО ПЕРЕВИТОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА У МЫШЕЙ**

<sup>1</sup> *ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*

<sup>2</sup> *ООО «Шиитаке», Санкт-Петербург*

### **РЕЗЮМЕ**

В эксперименте на мышах С57В1 и мышах-гибридах F1(C57BlxСВА) изучено действие водной суспензии грибов (ВСГ) *Lentinus edodes* (Шиитаке, Фунго-Ши) на рост подкожно перевитой аденокарциномы Эрлиха (АКЭ). Показано, что пероральное введение ВСГ в дозе 188 и 376 мг/кг приводит к торможению роста АКЭ, определяемого по объему (42, 50 и 53 %), у мышей С57В1 и F1(C57BlxСВА) и достоверному снижению массы опухоли на 26,2 % у мышей-гибридов. Введение здоровым мышам ВСГ (188 мг/кг) приводит к достоверному в 4,9 раза повышению общего количества клеток перитонеального содержимого, в основном за счет возрастания количества лимфоцитов. При регулярном пероральном поступлении в организм мышей с опухолями ВСГ Шиитаке, отмечается нормализация этого иммунологического показателя, повышенного в 4,7 раза у животных с АКЭ. ВСГ при введении мышам с опухолями стимулировала функциональную активность макрофагов, определяемую по образованию активных форм кислорода и оксида азота.

**Ключевые слова:** аденокарцинома Эрлиха, грибы *Lentinus edodes* (Шиитаке), торможение роста опухоли, макрофаги, активные формы кислорода, нитриты, нитраты.

### **ВВЕДЕНИЕ**

В системе противоопухолевой защиты важная роль принадлежит неспецифической противоопухолевой резистентности, составляющими элементами которой являются макрофаги, нейтрофилы и НК-клетки (natural

killer). Макрофаги и нейтрофилы распознают и эффективно элиминируют трансформированные и опухолевые клетки независимо от того, экспрессируют ли последние специфические опухолевые антигены. Помимо этого макрофаги и нейтрофилы играют инструкторную

и контролирующую роль в индукции специфического (адаптивного) иммунитета [5; 6]. Один из путей реализации их эффекторных и регуляторных функций состоит в активации NADPH-зависимой оксидазы, что приводит к образованию ряда высокоактивных форм кислорода (супероксид анион-радикал, пероксид водорода, гидроксильный радикал, синглетный кислород). Все эти соединения обладают мощным окислительным и антимикробным потенциалом и в значительной мере определяют цитостатическое и цитотоксическое действие макрофагов и нейтрофилов, в т. ч. по отношению к опухолевым клеткам [1; 9].

К настоящему времени накопились сведения о том, что многие соединения, входящие в состав грибов Шиитаке, обладают иммуномодулирующим действием, активирующим звено неспецифической противоопухолевой защиты, и повышают продукцию интерферона в крови. Японский гриб *Lentinus edodes* (Шиитаке) характеризуется сложным составом, включающим полисахариды, простые сахара, аминокислоты, липиды, алкалоиды, фенолы, витамины группы В, С, эргостеролы, минеральные вещества и другие соединения. Его биорегулирующие эффекты связывают прежде всего с полисахаридом лентинаном, проявляющим модифицирующее действие на активность клеток врожденного иммунитета. Полисахарид лентинан представляет собой полиглюкан с  $\beta$ 1–3-связями в основной цепи и  $\beta$ 1–6 — в боковой с м.м. 500 000 и составляет основную часть полисахаридного комплекса гриба. Высказывается мнение, что лентинан (как и классические иммуномодуляторы тимозин, Т-активин, левамизол) обладает биорегулирующим разнонаправленным эффектом, способным усиливать слабую, ослаблять сильную или оставлять без изменения нормальную реакцию иммунной системы [7; 13]. Показано, что лентинан, входящий в состав грибов *Ganoderma L.*, вызывал у больных меланомой усиление Т-киллерной активности и нормализовал другие показатели клеточного иммунитета [7]. Иммунокорригирующие свойства лентинана, входящего в состав грибов *Lentinus edodes*, послужили основанием для изучения протекторного действия водной суспензии из этих грибов на рост опухоли у мышей.

**Цель** настоящего исследования — экспериментальное изучение профилактического действия грибов *Lentinus edodes* в отношении опухоли и возможного механизма его реализации в эксперименте *in vivo*.

**Задачи** исследования:

- изучение влияния грибов на рост перевивной аденокарциномы Эрлиха (АКЭ);
- модулирование важных элементов противоопухолевой защиты — функциональной активности макрофагов перитонеального содержимого и активности NO-синтазы.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали высушенные, измельченные плодовые тела грибов Шиитаке (Фунго-Ши) в виде порошка (ТУ 9164-001-03682201-2002). На основе этого

сырья производится БАД «Шиитаке» (ТУ 9164-001-71260555-03), в котором общее количество полисахаридов составляет 24 %, из них полиглюкана лентинана содержится не менее 4,5 %. Порошок грибов (ПГ) растворяли в дистиллированной воде. Перед введением мышам суспензию грибов дополнительно перемешивали и вводили перорально в объеме 0,3 мл водной суспензии грибов (ВСГ) каждому животному. Работа проведена на 82 мышах-самках линии С57В1 и F1(С57В1хСВА) разведения питомника «Столбовая» РАМН.

52 мыши С57В1 массой 29–31 г были разделены на пять групп:

1-я группа — интактные мыши (здоровые мыши);  $n=5$ ;

2-я группа — здоровые мыши, получавшие ВСГ 5 раз в неделю в течение 64 дней из расчета 188 мг/кг;  $n=5$ ;

3-я группа — мыши с подкожно перевитой АКЭ ( $10^6$  клеток в 0,5 мл раствора Хенкса), получавшие перорально 5 раз в неделю дистиллированную воду в течение 64 дней;  $n=13$ ;

4-ю и 5-ю группы по 14 и 15 мышей в каждой составляли мыши с перевитой АКЭ, получавшие 5 раз в неделю в течение 28 дней до перевивки и 36 дней после перевивки опухоли ВСГ в разовой дозе 188 или 376 мг/кг.

Общее количество ПГ, полученное каждым животным на протяжении всего эксперимента, при введении дозы 188 мг/кг составило 282 мг, а при введении дозы 376 мг/кг — 564 мг.

Мыши-гибриды F1(С57В1хСВА) массой 28–30 г были разделены на две группы (контроль — 6-я группа и опыт — 7-я группа) по 15 особей в каждой. Продолжительность введения ВСГ мышам 7-й группы в разовой дозе 188 мг/кг составила 14 дней до перевивки АКЭ и 32 дня после перевивки с частотой введения 5 раз в неделю. Суммарная доза, полученная каждой мышью, составила 192 мг ПГ.

Штамм опухоли получен из банка ГУ РОНЦ. В опытах на мышах-самках С57В1 и F1(С57В1хСВА) использовали 2–3 пассажа опухоли *in vivo*.

*Ингибирующий эффект* ВСГ оценивали по торможению роста опухоли (ТРО) у животных опытных групп по сравнению с контрольной группой:

$$\text{ТРО} = [(V_k - V_{оп})/V_k] \times 100 \%,$$

где  $V_k$  — средний объем опухоли в контрольной группе;  $V_{оп}$  — средний объем опухоли в опытной группе ( $\text{мм}^3$ ).

Принимая во внимание, что форма опухоли не чисто сферическая и более напоминает эллипсоид, объем опухоли определяли по формуле для расчета объема эллипсоида:

$$V = A \times B \times C \times \pi/6,$$

где А, В, С — длина большой, средней и малой оси [2].

*Выделение активных форм кислорода* фагоцитами крови и перитонеальной жидкости (нейтрофилами, моноцитами и макрофагами) определяли по люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) [3; 4; 12], регистрируемой прибором «Биолюмат», модель 9500

(Berthoold, Германия). Резидентные клетки перитонеальной жидкости получали промыванием брюшной полости раствором Хенкса в объеме 2 мл. Перитонеальные клетки осаждались на предметном стекле в термостате при температуре 37 °С в течение 20 мин. После фиксации в метаноле и окрашивания по Романовскому—Гимзе определяли клеточный состав перитонеальной жидкости по морфологическим критериям. Для постановки реакции определения спонтанной (СХЛ) и фагоцитозависимой хемилюминесценции (ФЗХ) крови и клеток перитонеального содержимого смешивали 0,2 мл раствора Хенкса + 0,1 мл люминола (0,56 мМ) + 0,1 мл крови (предварительно разведенной 4 раза раствором Хенкса) или 0,1 мл перитонеальной жидкости. В качестве активатора фагоцитоза использовали грибы *Candida albicans*, опсонизированные сывороткой 10–12 здоровых доноров. ХЛ измеряли в течение 30 мин с интервалом 5 мин. Известно, что хемилюминесцентный ответ крови и перитонеальной жидкости определяется, в основном, фагоцитирующими клетками — нейтрофилами, моноцитами и макрофагами, способными продуцировать активные формы кислорода. Учитывая это, а также исходя из клеточного состава изучаемого объекта, можно предположить, что в крови уровень АФК определяется в основном нейтрофилами. Моноциты, присутствующие в крови в меньшем количестве и проявляющие более низкую хемилюминесцентную активность (до 10 раз), вносят меньший вклад в общий хемилюминесцентный отклик крови [14; 15]. Принимая это соотношение, приходим к выводу, что хемилюминесцентная активность перитонеальной жидкости, содержащей  $m$  макрофагов и  $n$  нейтрофилов, эквивалентна активности  $m + 10n$  макрофагов. Отсюда активность одного макрофага может быть оценена (по хемилюминесцентному отклику) как  $ХЛ/(m + 10n)$ .

*Содержание нитритов (НИ) в биологических жидкостях* — крови, перитонеальном содержимом и моче — определяли методом Грисса [4]. Нитраты (НА) при их определении предварительно восстанавливали до НИ пористым кадмием и анализировали тем же методом. Для сбора мочи мышей помещали по 6 штук в обменные клетки на сутки, лишив корма при свободном доступе к дистиллированной воде. Во избежание разрушения НИ в емкости для сбора мочи вносили 0,3 мл 30% гидроксида натрия. При анализе НА и НИ в опухолевой ткани опухоль измельчали на мелкие кусочки, тщательно растирали в фарфоровой ступке. Опухолевую ткань (навеска 3–5 г) экстрагировали в дистиллированной воде (40 мл) на водяной бане при температуре 90 °С в течение 15 мин. Затем экстракт охлаждали до комнатной температуры и доводили дистиллированной водой до 50 мл. Для удаления белково-углеводной составляющей в экстракте опухолевой ткани, перитонеальном содержимом и моче использовали водные растворы калия железисто-синеродистого и цинка серноокислого [4].

*Антиоксидантную активность (АОА) водного экстракта грибов Шиитаке* оценивали в тест-системе, предложенной Ю. О. Теселкиным и соавт. [10].

Метод основан на способности антиоксидантов продукта перехватывать свободнорадикальные соединения (супероксидный анион-радикал, гидроксильный радикал, феррил-радикалы Нb), образующиеся в системе гемоглобин — пероксид водорода — люминол и подавлять люминолзависимую хемилюминесценцию. Оценку АОА продукта проводили по двум параметрам: временному интервалу задержки (латентному периоду) развития ХЛ и максимальной интенсивности ХЛ. Водный экстракт из грибов (экстрагирование при температуре 90 °С в течение 15 мин) вносили в реакционную смесь в растворе Хенкса перед иницированием свободнорадикального окисления до достижения концентрации 50, 100, 200, 300, 500 и 700 мкг/мл (в расчете на исходный продукт).

Статистическую обработку данных, представленных как среднее арифметическое значение  $\pm$  стандартное отклонение, проводили, используя критерий Стьюдента [11].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 (опыт 1, опыт 2) представлены результаты действия ВСГ Шиитаке на рост АКЭ у мышей С57В1 и F1(С57В1хСВА) с 5-го по 33-й день наблюдения после трансплантации опухоли.

Как видно из приведенных данных, опухоль была чувствительна к длительному введению ВСГ в максимальной разовой дозе 376 мг/кг у мышей С57В1. При этой дозе наиболее выраженное достоверное ТРО регистрируется к 12-м суткам и составляет 53 % ( $p < 0,01$ ). На ранних сроках наблюдения у некоторых мышей этой группы опухоли не пальпировались. При введении мышам меньшей дозы (188 мг/кг) эффективность регистрировалась на уровне ТРО 42 % ( $p < 0,05$ ) в те же сроки, что и при введении максимальной дозы. После 15 сут объем опухоли (среднее значение) у мышей, потреблявших ВСГ, был на 20–30 % меньше, чем у контрольных животных, и такое различие регистрировали до конца эксперимента. Случаи гибели мышей С57В1 с АКЭ, которым вводили ВСГ, имели место в более поздние сроки, чем в контроле, и регистрировались на 54-е сутки от начала введения ВСГ.

У мышей-гибридов F1(С57В1хСВА) менее продолжительное профилактическое введение ВСГ в дозе 188 мг/кг вызывает достоверное торможение роста АКЭ на ранних сроках наблюдения, максимум которого отмечается к 8–11-м суткам роста опухоли и составляет 50 % ( $p < 0,01$ ). После 14 сут роста средний объем опухоли у мышей-гибридов был на 14–20 % ниже этого показателя у контрольных животных.

Взвешивание опухолей у мышей С57В1 4-й и 5-й группы на 37-е сутки после трансплантации АКЭ выявило незначительное (на 20 и 23 %) снижение средней массы опухолей (см. табл. 1, опыт 1).

Следует подчеркнуть, что у мышей-гибридов F1(С57В1хСВА) регистрируется достоверное ингибирование роста опухоли по массе, которое составляет 27 % ( $p = 0,02$ ).

Таблица 1.

**Влияние ВСГ *Lentivirus edodes* (Шиитакэ) на динамику роста опухоли у мышей C57Bl и F1(C57BlxСВА) с подкожно перевитой АКЭ**

## Опыт 1. Мыши C57Bl

Группа, доза ВСГ, мг/кг	Объем опухоли*, мм <sup>3</sup>									Масса опухоли на 37-е сутки, мг
	Сутки после перевивки опухоли									
	5-е	8-е	12-е	15-е	18-е	21-е	25-е	28-е	33-и	
3-я АКЭ	29±16 n=13	110±74 n=13	621±340 n=13	1283±924 n=13	1629±805 n=13	2472±1251 n=13	3359±1443 n=13	3985±1727 n=11	5196±1796 n=11	5173±1558 n=11
4-я АКЭ+ 188	20±16 n=15	109±95 n=15	362±263** n=15	814±550 n=15	1260±660 n=15	2032±1007 n=15	2678±1253 n=15	2953±1163 n=15	4169±1793 n=15	4126±1742 n=14
5-я АКЭ+ 376	23±19 n=14	90±59 n=14	295±204*** n=14	734±363** n=14	1264±629 n=14	1777±604 n=14	2416±1165 n=14	2885±1456 n=14	4193±2113 n=14	3983±1605 n=13

## Опыт 2. Мыши F1(C57BlxСВА)

Группа, доза ВСГ, мг/кг	Объем опухоли*, мм <sup>3</sup>								Масса опухоли на 31-е сутки, мг
	Сутки после перевивки опухоли								
	6-е	8-е	11-е	14-е	18-е	21-е	25-е	28-е	
6-я АКЭ	151±77 n=15	207±92 n=15	475±267 n=15	742±322 n=15	1543±692 n=15	2134±805 n=15	2722±1142 n=15	3682±1244 n=15	3065±970 n=15
7-я АКЭ+188	82±65** n=15	103±94*** n=15	248±220** n=15	590±280 n=15	1269±485 n=15	1760±713 n=15	2333±1011 n=15	3087±1628 n=15	2261±775** n=14

\* M±SD, где M — средний объем опухоли, мм<sup>3</sup>; SD — стандартное отклонение.

\*\* p < 0,05.

\*\*\* p < 0,01.

В табл. 2 приведены показатели ТРО в зависимости от суммарной дозы ВСГ. Как видно из приведенных данных, мыши-гибриды с АКЭ, которые получили меньшее суммарное количество ВСГ, были более чувствительны к его действию, чем мыши C57Bl. Достоверный показатель ТРО у мышей-гибридов фиксировали на самом раннем этапе роста АКЭ после 20-го дня введения ВСГ, суммарное количество которой к этому сроку составило 85 мг/мышь (разовая доза 188 мг/кг).

Мыши C57Bl с АКЭ были более резистентны к действию ВСГ. Достоверный эффект ТРО проявлялся только начиная с 40-го дня при получении каждой мышью 4-й и 5-й группы суммарных доз ВСГ 164 и 327 мг соответственно.

Можно предположить, что менее продолжительное профилактическое введение ВСГ мышам F1(C57BlxСВА) является оптимальной схемой, при которой эффект ТРО выявляется на более ранних сроках.

Анализ данных лейкоцитарного состава клеток крови, полученной у мышей C57Bl по завершению эксперимента (табл. 3), показывает, что мыши с АКЭ характеризуются более высоким уровнем лейкоцитов по сравнению с мышами интактной группы, причем у мышей, потреблявших ВСГ, отмечается рост этого показателя. Наряду с этим в крови животных с опухолью наблюдается увеличение относительного количества нейтрофилов в 3,7–4,7 раза, а введение ВСГ несколько усиливает эту тенденцию.

Данные определения функциональной активности нейтрофилов в крови по выделению активных форм кислорода в хемилюминесцентном тесте показывают снижение активности нейтрофилов в спонтанном состоянии на 32,5–44,7 % у мышей с опухолью линии C57Bl. Введение ВСГ не корректировало этого показателя. При стимулировании фагоцитарного процесса *Candida albicans* показатель ФЗХ крови мышей с АКЭ, независимо от того, вводили ВСГ или нет, был близким к значениям для интактной группы.

Таблица 2.

Торможение роста подкожно перевитой АКЭ у мышей при длительном введении ВСГ *Lentinus edodes*

## Мыши C57Bl

Группа, доза ВСГ, мг/кг	ТРО, %								
	Сутки после начала введения ВСГ								
	33-и	36-е	40-е	43-и	46-е	49-е	53-и	56-е	61-е
4-я 188	31 (130)	0 (147)	42* (164)	37 (180)	23 (186)	18 (203)	20 (214)	26 (237)	20 (254)
5-я 376	21 (259)	18 (293)	53** (327)	43* (361)	22 (372)	28 (408)	28 (429)	28 (474)	19 (508)

## Мыши F1(C57BlxCBA)

Группа, доза ВСГ, мг/кг	ТРО, %							
	Сутки после начала введения ВСГ							
	20-е	22-е	25-е	28-е	32-е	35-е	39-е	42-е
6-я 188	46* (85)	50** (96)	48* (102)	20 (118)	18 (130)	18 (147)	14 (158)	16 (175)

\* p &lt; 0,05.

\*\* p &lt; 0,01.

\*\*\* В скобках приведена суммарная доза, полученная каждой мышью после начала введения ВСГ, мг.

Определение клеточного состава перитонеального содержимого мышей (табл. 4) показывает, что введение здоровым мышам ВСГ (188 мг/кг) приводит к достоверному повышению в 4,9 раза общего количества клеток. Увеличение количества клеток в перитонеальной жидкости здоровых мышей при введении ВСГ происходило в основном за счет возрастания доли и абсолютного количества лимфоцитов и, в меньшей мере, моноцитов и макрофагов. Увеличение общего количества клеток в перитонеальном экссудате в 4,7 раза в сравнении с животными интактной группы присуще и мышам с АКЭ, не потреблявшим ВСГ. В то же время у мышей с АКЭ, которым регулярно вводили перорально ВСГ, наблюдали нормализацию показателя общего количества клеток, сравнимого с уровнем здоровых мышей. У животных с АКЭ видовой состав клеток в перитонеальном содержимом (соотношение макрофагов, нейтрофилов, тучных клеток, лимфоцитов) отличается существенным возрастанием относительного количества нейтрофилов в 6,1–6,9 раза и одновременным снижением доли макрофагов в 2,2–2,4 раза. Введение ВСГ практически не сказывалось на видовом соотношении клеток у мышей с опухолью.

Измерение ХЛ макрофагов перитонеального содержимого у мышей с АКЭ, потреблявших ВСГ, выявило существенное повышение активности этих клеток как в спонтанном состоянии, так и при их активации *Candida albicans* (табл. 5). Особенно наглядно это проявляется у мышей, получавших ВСГ в разовой дозе 188 мг/кг, активность макрофагов у которых в спонтанном состоянии возросла в 36,8 раза, а при их активации — в 58,2 раза в сравнении с таким же показателем для мышей с АКЭ. Более высокая доза вводимых ВСГ (376

Таблица 3.

Лейкоцитарный состав крови мышей C57Bl с подкожно перевитой АКЭ при введении ВСГ *Lentinus edodes*

Группа, (доза ВСГ, мг/кг)	Количество животных	Количество лейкоцитов в 1 мкл, $\times 10^3$	Содержание в крови, %			
			Эозинофилы	Моноциты	Нейтрофилы	Лимфоциты
1-я Интактные	5	3,77±0,45	—	8,8±2,6	12,2±3,2	79±3,5
2-я Интактные + ВСГ (188)	5	3,08±0,64	0,4±0,6	5,2±2,1	15,6±5,0	78,8±8,2
3-я АКЭ	9	4,61±1,8	0,4±0,7	12,4±5,8	45,6±9,4*	41,6±9,6*
4-я АКЭ+ВСГ (188)	7	5,19±1,94	0,3±0,5	9,0±6,2	50,7±19,4*	40,0±23,2*
5-я АКЭ+ВСГ (376)	6	6,31±1,38**	0,5±0,5	13,7±8,8	57,0±17,4*	28,8±16*

\* p &lt; 0,01 (в сравнении с показателем интактных животных).

мг/кг) также вызвала хотя и значимую активацию макрофагов, но в существенно меньшей степени — в 6,2 и 13,4 раза. Наряду с этим еще один показатель — коэффициент усиления активности макрофагов при их инкубации с *Candida albicans*, отражающий скрытый потенциал клеток, — по сравнению с показателем СХЛ указывает на рост функциональной активности макрофагов перитонеального содержимого мышей, получавших грибы.

Таблица 4.

Клеточный состав перитонеальной жидкости мышей C57Bl с подкожно перевитой АКЭ при введении ВСГ *Lentinus edodes*

Группа, (доза ВСГ, мг/кг)	Количество животных	Количество клеток в 1 мкл, $\times 10^3$	Содержание в перитонеальной жидкости, % (абсолютное кол-во, $\times 10^3$ /мкл)			
			Макрофаги+ моноциты	Нейтрофилы	Тучные клетки	Лимфоциты
1-я Интактные	5	8,5±1,2	27,4±8,6 (2,33)	2,1±0,6 (0,18)	0,7±0,5 (0,06)	69,8±12,1 (5,93)
2-я Интактные+ ВСГ (188)	5	41,5±8,7**	15,3±1,2* (6,35)	1,2±0,3* (0,5)	1,0±0,4 (0,42)	82,5±1,3* (34,23)
3-я АКЭ	10	39,8±16,1**	11,4±5,6** (4,54)	13,2±11,4 (5,25)	1,4±1,0 (0,56)	74,0±10,8 (29,45)
4-я АКЭ+ ВСГ (188)	7	7,4±2,6***	11,9±3,6** (0,88)	13,0±5,7** (0,96)	2,4±2,9 (0,18)	72,7±5,3 (5,38)
5-я АКЭ+ВСГ (376)	7	7,4±3,0***	12,2±6,1** (0,9)	14,4±7,1** (1,07)	0,6±0,6 (0,04)	72,8±12,1 (5,39)

\* p &lt; 0,05.

\*\* p &lt; 0,01 в сравнении с мышами интактной группы.

\*\*\* p &lt; 0,01 в сравнении с показателем для мышей с АКЭ.

Результаты определения нитритов (НИ) и нитратов (НА) в опухолевой ткани, перитонеальном содержимом, моче, приведенные в табл. 6, отражают интенсивность их эндогенного образования в организме. Источником эндогенного образования НИ и НА является оксид азота, продукт активности NO-синтаз (конститутивной и индуцибельной). Оксид азота, окисляясь, образует более стабильные соединения — НИ и НА. Принято считать, что способность к активации индуцибельной NO-синтазы (NO-c) в макрофагах, моноцитах, нейтрофилах является одной из важных ха-

Таблица 5.  
Хемилюминесцентная активность макрофагов перитонеального содержимого мышей C57Bl с перивитой АКЭ при введении ВСГ *Lentinus edodes*

Группа (доза ВСГ, мг/кг)	Количество животных	Хемилюминесценция, рассчитанная на 10 <sup>3</sup> макрофагов, имп./мин		
		спонтанная	фагоцитзависимая	коэффициент усиления
1-я Интактные	5	4,2±1,5	114±14,8	27,1
2-я Интактные + ВСГ (188)	5	3,0±1,4	64,8±20,8	21,6
3-я АКЭ	8	7,9±3,6	38,1±10,1	4,8
4-я АКЭ+ ВСГ (188)	6	291±104,4*	2219,7±1051,2*	7,6
5-я АКЭ+ ВСГ (376)	6	49,3±17,7*	509,3±131,4*	10,3

\*p < 0,01 в сравнении с показателем для животных с АКЭ

рактических неспецифической противоопухолевой резистентности этих клеток. Имеются данные о том, что рост и стадия опухоли связаны с изменением содержания NO-с в опухолевой ткани [8; 16].

Определение НИ и НА в опухолевой ткани (см. табл. 6) выявило достоверное снижение в 2,2 раза образования НА в опухолевой массе мышей, получавших ВСГ в дозе 188 мг/кг, в сравнении с мышами с АКЭ. В то же время в опухолях мышей, получавших максимальную дозу ВСГ (376 мг/кг), содержание НИ и НА было на уровне мышей контрольной группы.

Анализ НИ в перитонеальной жидкости мышей показал более высокий их уровень у интактных мышей. Животные с опухолями имели на 29,4–64,7 % бо-

Таблица 6.  
Содержание нитритов и нитратов в опухолевой ткани и биологических жидкостях мышей C57Bl

Группа (доза ВСГ, мг/кг)	Опухолевая ткань, мкг/г		Перитонеальная жидкость, мкг/мл		Моча, мкг/кг*	
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
1-я Интактные	(-)	(-)	0,34±0,05 n=6	(-)	0	25,4
2-я Интактные+ВСГ (188)	(-)	(-)	0,24±0,04** n=6	(-)	(-)	(-)
3-я АКЭ	0,62±0,17 n=5	3,3±1,1 n=5	0,12±0,03** n=6	(-)	28,4	213,3
4-я АКЭ+ ВСГ (188)	0,66±0,26 n=5	1,51±0,44*** n=5	0,12±0,04** n=6	(-)	0	138,9
5-я АКЭ+ВСГ (376)	0,79±0,28 n=5	3,6±1,2 n=5	0,24±0,05 n=6	(-)	22,2	226,1

(-) — не определяли.

\* Приведены данные для 6 животных, объединенных в группу.

\*\* p < 0,01 в сравнении с показателем для мышей интактной группы.

\*\*\* p < 0,01 в сравнении с показателем для мышей с АКЭ.

лее низкое содержание НИ в перитонеальной жидкости. Наиболее интенсивное выведение НИ и НА с мочой, отражающее суммарное количество эндогенного образования их в течение суток, зафиксировано у мышей с АКЭ и у мышей с опухолями, получавших максимальную дозу ВСГ. Образование этих соединений превышает в 8,4 и в 8,9 раза уровень, определяемый у здоровых животных.

Проведено исследование на наличие антиоксидантных свойств у водного экстракта грибов Шиитак в системе *in vitro* (табл. 7). Принимая во внимание, что при опухолевом росте усилены свободнорадикальные процессы, можно ожидать, что вещества с выраженными антиоксидантными свойствами могут модулировать рост и развитие опухолей. Экстрагирование препарата Шиитак горячей водой (90 °С), позволяет обогатить экстракт грибов водорастворимыми гетерополисахаридами, связанными с белком и состоящими из глюкозных, маннозных, арабинозных и галактозных остатков, которые предположительно могут обладать антиоксидантными свойствами.

Исследование показало, что грибы Шиитак при концентрации до 75 мкг/мл в реакционной смеси не проявляют антиоксидантных свойств, определяемых в модельной системе гемоглобин — люминол — пероксид водорода. При более высоких концентрациях (от 100 мкг/мл и выше) регистрируется задержка развития и одновременное снижение максимума ХЛ. При этом проявляется дозозависимое антирадикальное действие грибов, определяемое как по задержке развития ХЛ, так и по максимуму ХЛ отклика. Антирадикальная активность грибов, начиная от концентрации 100 мкг/мл и выше, находится в прямой зависимости от количества грибов в реакционной смеси и в пересчете на эквивалентный раствор аскорбиновой кислоты составляет 0,16–0,26 мкг/мл. Сравняя с известными водорастворимыми антиоксидантами (аскорбиновая кислота, проантоцианидины, антоцианы, ликопин и др.), экстракт грибов можно отнести скорее к слабым антиоксидантам. В то же время, учитывая возможность поступления в организм человека в составе рациона значимых количеств (100 г и более), нельзя пренебречь их антирадикальными свойствами.

Таблица 7.  
Антирадикальная активность водного экстракта грибов *Lentinus edodes in vitro*

Концентрация грибов <i>Lentinus edodes</i> , мкг/мл	Задержка развития ХЛ, с*	Максимальное значение ХЛ, ударов/10 с × 10 <sup>3</sup> *	Антирадикальная активность аскорбиновой кислоты, мкг/мл*
Контроль**	3	159	—
50	3	150	0
100	5	85	0,16
200	12	69	0,17
300	18	60	0,19
500	29	42	0,23
700	42	30	0,26

\* Результаты приведены как среднеарифметические значения трех параллельных определений.

\*\* Контроль — Nb+люминол+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Таким образом, результаты экспериментального исследования показывают, что ВСГ Шиитаке вызывают замедление роста АКЭ как у мышей C57Bl, так и у мышей-гибридов, причем этот эффект более отчетливо проявляется при введении максимальной дозы вещества (376 мг/кг) и составляет 53 %. Рост опухоли сопровождается увеличением количества лейкоцитов в крови с одновременным увеличением относительного количества нейтрофилов. У животных с опухолями усилены свободнорадикальные процессы со стимуляцией образования нитросоединений (НИ и НА), по-видимому, в основном за счет их образования в опухолевой ткани. Введение ВСГ здоровым животным приводило к увеличению общего количества клеток в перитонеальном содержимом, прежде всего, за счет лимфоцитов и макрофагов. Поступление ВСГ в организм мышей до трансплантации АКЭ и в течение роста опухоли нормализовало количественный показатель содержания клеток в перитонеальной жидкости и одновременно вызвало выраженную активацию макрофагов перитонеального содержимого.

В работе выявлено снижение содержания НИ в перитонеальной жидкости мышей с опухолями, что может являться следствием подавления продукции макрофагами и нейтрофилами оксида азота и его метаболитов под влиянием продуцируемых опухолью активных соединений. Ранее было показано, что оксид азота, секретируемый макрофагами и нейтрофилами, выполняет защитную роль, направленную на инактивацию чужеродных клеток, в т. ч. и опухолевых [8; 16]. ВСГ в дозе 376 мг/кг корригировала активность макрофагов по показателю образования оксида азота до уровня активности клеток у здоровых мышей. Что касается образования НИ и НА в опухолевой ткани, то ВСГ либо не влияла на содержание продуктов окисления оксида азота в опухоли, либо существенно снижала его.

### ВЫВОДЫ

1. ВСГ *Lentinus edodes* (Шиитаке) достоверно замедляет рост подкожно перевитой аденокарциномы Эрлиха у мышей-самок C57Bl и F1(C57BlxCBA). Торможение роста АКЭ (53 %) более отчетливо проявляется при длительном профилактическом введении максимальной дозы ВСГ в течение 28 дней до и 36 дней после перевивки опухоли.

2. ВСГ Шиитаке обладает иммуномодулирующим действием, нормализуя общее количество иммунокомпетентных клеток в перитонеальном содержимом и усиливая функциональную активность перитонеальных макрофагов у мышей с опухолями.

3. У животных с АКЭ, независимо от введения ВСГ, повышено эндогенное образование нитросоединений: выведение НИ с мочой (отсутствующее в контроле) достигало 28,4 мкг/кг, а НА — увеличилось в 8,4–8,9 раза.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Билынский Б. Т., Володько Н. А., Шпарык Я. В. Иммунологические механизмы естественной противоопухолевой резистентности. — Киев: Наукова думка, 1991. — 248 с.
2. Бронштейн И. Н., Семендяев К. А. Справочник по математике для инженеров и учащихся ВТУЗОВ. — М.: Наука, 1986. — С. 208.
3. Владимиров Ю. А., Азизова О. А., Деев А. И. и др. Свободные радикалы в живых системах. — Итоги науки и техники / Сер. «Биофизика». — М.: ВИНТИ, 1991. — № 24. — С. 177.
4. Дерягина В. П. Экспериментальное изучение функциональной активности нейтрофилов и макрофагов в условиях воздействия нитрита натрия // Биомед. хим. — 2003. — Т. 49, № 1. — С. 19–26.
5. Дейчман Г. И. Естественный отбор и ранние изменения фенотипа опухолевых клеток *in vivo*: приобретение новых механизмов защиты // Биохимия. — 2000. — Т. 65, вып. 1. — С. 92–111.
6. Дейчман Г. И. Итоги науки и техники / Сер. «Онкология». — М.: ВИНТИ, 1984. — № 13. — С. 46–70.
7. Купин В. И., Уткина М. В., Малахова Н. В. и др. Препараты растительного происхождения — перспективные индукторы цитокинов в организме в норме и патологии // Вестник ОНЦ АМН России. — 1994. — № 2. — С. 12–19.
8. Проскуряков С. Я., Коноплянников А. Г., Иванников А. И. и др. Оксид азота в неопластическом процессе // Вопр. онкол. — 2001. — Т. 47, № 3. — С. 257–269.
9. Суслов А. П. Итоги науки и техники / Сер. «Онкология». — М.: ВИНТИ, 1990. — № 19. — С. 167.
10. Теселкин Ю. О., Бабенкова И. В., Любицкий О. Б. и др. // Вопр. мед. хим. — 1997. — Т. 43, вып. 2. — С. 87–93.
11. Урбах В. Ю. Биометрические методы. — М.: Медицина, 1964. — 416 с.
12. Хаитов Р. М., Пинегин Б. В., Истамов Х. И. Экологическая иммунология. — М.: ВНИРО, 1995. — 219 с.
13. Bang Luu // International Symposium on Ganoderma Lucidum, 4th, Seul, 1992. — P. 49–52
14. Heberer M., Ernst M., Harder F. // Cancer Detect Preven. — 1983. — Vol. 6. — P. 273–280.
15. Kato T., Wokalek H., Schopf E. et al. Measurement of chemiluminescence in freshly drawn human blood // Klin. Wochenschr. — 1981. — Vol. 59. — P. 203–211.
16. Tamir S., Tanenbaum S. R. The role nitric oxide (NO) in the carcinogenic process // Biochim. Biophys. Acta. — 1996. — Vol. 14. — P. 31–36.

Поступила 30.06.2005.