

ISSN 1726-9784

РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№3 Том 8 2009 г.

УДК 616-085.2/.3

Учредители

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

Главный редактор

А.Ю. Барышников, д-р мед. наук, проф.

Заместители главного редактора

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

Редколлегия

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

Редакционный совет

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

«Российский биотерапевтический журнал» является рецензируемым изданием

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

Регистрационный номер:

ПИ №77-11695 от 21.01.2002 г.

Почтовый адрес:

115478 Москва, Каширское ш., 24

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей

Тел.: +7 (495) 323 57 00, +7 (495) 324 10 65; факс: +7 (495) 324 22 74;

E-mail: biotherapy_rbj@mail.ru

Интернет-версия: www.ronc.ru/1915

Подписной индекс 81679

Объем 7,5 усл.-печ. листов,

подписано в печать 02.10.2009

Тираж 1000 экз.

Издательская группа РОНЦ:

115478 Москва, Каширское шоссе, д. 24.

Тел. +7 (495) 324 24 70; ronc@list.ru

Координаторы: Е.Г. Турнянская, Б.Б. Крюков (макет)

Принт-менеджмент:

Типография «Огни Москвы»

Тел.: +7 (494) 933-87-78

info@ognimsk.ru, www.ognimsk.ru

СОДЕРЖАНИЕ

БИОТЕРАПИЯ:

<i>Воробьев С.И.</i> БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НЕИОНОГЕННЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ – СТАБИЛИЗАТОРОВ ЭМУЛЬСИЙ	3
<i>Макарова М.В., Доннер Н.Е., Флейшман Д.И., Морозова О.В., Лазаревич Н.Л.</i> ЧАСТИЧНАЯ РЕВЕРСИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ФЕНОТИПА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ИНАКТИВАЦИЕЙ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА $\beta 2$	9
<i>Мосиенко В.С., Шляховенко В.А., Яниш Ю.В., Козак В.В., Карнаушенко Е.В., Вербиненко А.В., Милиневская В.А., Мазур О.В.</i> ВЛИЯНИЕ ГЛИКОПЕПТИДНОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНЫ НА РОСТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МЕТАСТАЗИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕЙ	15
<i>Хромова Н.В., Копнин П.Б., Степанова Е.В., Копнин Б.П.</i> ВЛИЯНИЕ ПОДАВЛЕНИЯ СИНТЕЗА VEGF-C В КЛЕТКАХ РАКА ЛЕГКОГО И ОБОЛОЧНОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА НА ИХ РОСТ, МИГРАЦИОННУЮ И АНГИОГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ	21
<i>Чмутин Е.Ф., Иванов П.К., Гриневич А.С.</i> РАЗРАБОТКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ОНКОЛОГИИ: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ	27

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОНКОЛОГИЯ:

<i>Ваня Боят, Оганесян Е.А., Балабаньян В.Ю., Алятудин Р.Н.</i> ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ ПАКЛИТАКСЕЛА	37
<i>Кладиев А.А., Степанова Е.В., Соломко Э.Ш., Кельцев В.А., Немцов Б.Ф., Барышников А.Ю.</i> АНТИАНГИОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПРОСПИДИНА <i>IN VITRO</i>	45

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ТЕРАПИЯ:

<i>Калишьян М.С., Седакова Л.А., Райхлин Н.Т., Трещалина Е.М., Лукашева Е.В.</i> ЭФФЕКТИВНОСТЬ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ПО СХЕМЕ АС В СОЧЕТАНИИ С БИНАРНОЙ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМОЙ ТЕРАФТАЛ+АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА НА МОДЕЛИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЫШЕЙ	51
<i>Лазарев А.Ф., Россаха А.В., Мамаев А.Н., Ходоренко С.А., Мамаева И.В., Назаров А.В., Цывкина Л.П., Баркаган З.С.</i> ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ФАКТОРА VHA ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ТРАНСФУЗИОННОЙ НАГРУЗКИ ВО ВРЕМЯ ОПЕРАЦИЙ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ	57
<i>Покровский В.С., Трещалина Е.М., Бычков М.Б.</i> ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ДИССЕМИНИРОВАННОГО МЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО	61
<i>Лесная Н.А., Покровский В.С., Романенко В.И., Трещалина Е.М.</i> ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ПЕРЕНОСИМОСТЬ КОМБИНАЦИЙ С ВКЛЮЧЕНИЕМ ЭТОПОЗИДА, ЦИСПЛАТИНА И АРАНОЗЫ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЭПИДЕРМОИДНОЙ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЛЬЮИС У МЫШЕЙ	69

КЛИНИЧЕСКАЯ ОНКОЛОГИЯ:

<i>Бершавили А.И., Лактионов К.П.</i> ПЕРВИЧНАЯ И ВТОРИЧНАЯ ОТЕЧНО-ИНФИЛЬТРАТИВНАЯ ФОРМЫ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: СХОДСТВО ИЛИ РАЗЛИЧИЯ?	75
<i>Иниаков А.Н., Оборотова Н.А., Барышников А.Ю., Трифонова Е.В., Катаева Е.В., Голенков А.К.</i> ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ САРКОЛИЗИНА <i>IN VITRO</i> И ЕГО КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИ РЕЗИСТЕНТНЫХ ФОРМАХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ	81
<i>Шаповалов Д.А., Комаров И.Г., Кузнецов В.В., Слетина С.Ю.</i> ВИДЕОХИРУРГИЯ КАК МЕТОД РАДИКАЛЬНОГО ЛЕЧЕНИЯ И ПОЛНОЦЕННОГО СТАДИРОВАНИЯ РАКА ТЕЛА МАТКИ	85
<i>Солодянкина Т.Н., Апанасевич В.И.</i> ОШИБКИ В ДИАГНОСТИКЕ I СТАДИИ МЕЛАНОМЫ КОЖИ	93
<i>Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Овчинникова Л.К., Дигаева М.А., Воротников И.К., Давыдов М.И.</i> БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ОПУХОЛЕЙ В КЛИНИКЕ – ДОСТИЖЕНИЯ, ПРОБЛЕМЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ	95
<i>Зейналова К.Р., Вишневская Я.В., Ганьшина И.П.</i> ТРАСТУЗУМАБ В КОМБИНАЦИИ С ДОЦЕТАКСЕЛОМ И КАРБОПЛАТИНОМ В НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ТЕРАПИИ МЕСТНОРАСПРОСТРАНЕННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ГИПЕРЭКСПРЕССИЕЙ HER-2 (КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)	103

ОБЗОРЫ:

<i>Дейчман А.М., Зиновьев С.В., Барышников А.Ю.</i> ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ И МАЛЫЕ РНК В ОНКОЛОГИИ	107
--	-----

К 75-ЛЕТИЮ ОЛЕГА НИКОЛАЕВИЧА ЧУПАХИНА

МАТЕРИАЛЫ VIII ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ «ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ». ТЕЗИСЫ	19, 8, 20, 26, 56, 80
---	-----------------------

УДК 616.155.1:612.118.221.3:615.014.423

С.И. Воробьев

БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НЕИОНОГЕННЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова

Контактная информация:

Воробьев Сергей Иванович, доктор биологических наук, лауреат Правительственной премии, академик РАЕН, профессор кафедры коллоидной химии.

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова

адрес: 119573 Москва, пр. Вернадского, 86; тел. +7(985) 923-82-24

e-mail: vorobyev@mail.ru

Статья поступила: 14.03.2009 г., принята к печати: 23.09.2009 г.

Резюме

В статье рассмотрены биологические и физико-химические свойства неионогенных поверхностно-активных веществ, применяемых в качестве стабилизаторов эмульсий на основе фторорганических и органических соединений медицинского применения. Исследования проведены на мышах, крысах, изолированных сердцах кролика, клетках линии *Raji* и эритроцитах. Как показали эксперименты, свойства эмульсий во многом зависят от поверхностного слоя, который образуют молекулы эмульгатора. Среди стабилизаторов эмульсий особое место занимают неионогенные блок-сополимеры окисей этилена и пропилена – проксанолы. Проксанолы, являясь выраженными детергентами, в низких концентрациях и с определенными физико-химическими свойствами оказывают активное биологическое действие. Это необходимо учитывать при использовании данного соединения в виде эмульгаторов. Изучению данного вопроса посвящена настоящая работа.

Ключевые слова: проксанолы, эмульсии, перфторуглероды, гемолиз эритроцитов.

S.I. Vorobyev

NEW APPROACH TOWARD CLINICAL TRIAL DESIGN OF TARGETED AGENTS

M.V. Lomonosov Moscow state academy of fine chemical technology

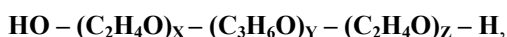
Abstract

Physico-chemical and biological properties of non-ionic surfactants used as emulgator for perfluorocarbon emulsions of medical use are considered in this paper. Investigations were carried out with mice, rats, isolated hearts of rabbits, *Raji* cell line and red blood cells. Our experiments showed, that properties of emulsions depend on surface layer in many cases, which was formed with the molecules of surfactants form. Among the stabilizers of emulsions, non-ionic block copolymers of ethylene and propylene oxides (procsanols) occupy a special place. Since the procsanols are evident detergents, they display high biological activity at the low concentrations and with definite properties. This should be taken into account when a given substance is used as a surfactant. Present paper is devoted to studying of this problem.

Key words: procsanol, red blood cell hemolysis, emulsion, perfluorocarbon.**Введение**

Многие вещества, например, перфторорганические соединения, нерастворимы в воде и для медико-биологических целей могут применяться только в виде субмикронных эмульсий. Наиболее распространёнными эмульгаторами медицинского применения являются НПАВ, которые способны хорошо растворяться в воде. Свойства эмульсий зависят во многом от поверхностного слоя, который образуют молекулы эмульгатора.

Среди стабилизаторов эмульсий особое место занимают неионогенные блок-сополимеры окиси этилена и пропилена – проксанолы (зарубежные аналоги – плуроники *F-68*). Проксанолы получают путём окисэтилирования полипропиленгликолей различной молекулярной массы. Блок-сополимеры окиси этилена и пропилена являются синтетическими соединениями, с общей формулой:



где X; Z – гидрофильные группы (полиоксиэтиленовые ПОЭ); Y – гидрофобная группа (полиоксипропиленовая ПОПР).

Проксанолы – это коллоидные вещества, молекулы которых способны образовывать в растворе

мицеллы, т.е. структуры-агрегаты из десятков и сотен молекул НПАВ. Условием мицеллообразования является наличие полярной структуры в молекуле НПАВ и большого углеводородного радикала. Мицеллы коллоидных НПАВ могут формировать дисперсную фазу наряду с дисперсной фазой из перфторсоединений. Известно, что проксанол-268 хорошо растворим в воде, его критическая концентрация мицеллообразования составляет 0,018 моль/м³.

При увеличении концентрации проксанола выше критической концентрации мицеллообразования происходит увеличение числа мицелл и изменяется их форма. Концентрация проксанола-268 в отечественных эмульсиях ПФОС составляет 4%, из этого количества НПАВ большая часть проксанола находится в не связанном с ПФОС состоянии, в виде определённой формы мицелл. Проксанолы обладают высокой поверхностной активностью и снижают межфазное натяжение на границе раздела фаз перфторуглерод/вода.

Поэтому, чем эффективнее тот или иной проксанол снижает величину поверхностного натяжения, тем выше стабильность эмульсии ПФОС. Высокая поверхностная активность проксанола-268 понижала поверхностное натяжение примерно на 10 мН/м уже при концентрации последнего порядка 10⁻⁹ моль/л.

При определенной молекулярной массе и соотношении полимерных блоков окиси пропилена и окиси этилена (20/80), проксанолы удовлетворяют ряду медико-биологических и технических требований: хорошо растворяются в воде, обладают малой токсичностью, предотвращают агрегацию тромбоцитов, улучшают реологические свойства крови и могут оказывать гемодинамическое действие благодаря своим коллоидно-осмотическим свойствам. Проксанол может улучшать микроциркуляцию, увеличивать текучесть крови, влиять на электромеханическое сопряжение миокарда, а также взаимодействовать с гидрофобными участками мембранных белков.

Материалы и методы

Химические объекты:

Использовались проксанолы, как технические, так и очищенные, с различной молекулярной массой – от 5700 до 8300 Д, как отечественные: П-168 №24, П-168 №38, П-268 №35, П-268 №1, так и зарубежные *F-68*. Очистка проксанолов производилась с помощью активированного угля. Получение эмульсий (эмульгирование) перфторорганических соединений производилось на дезинтеграторах высокого давления типа «Донор» до среднего размера частиц 0,05–0,15 мкм гомогенизационным способом [1; 2].

Биологические объекты:

В работе использовались белые беспородные мыши и крысы, изолированные сердца кроликов, культура клеток линии *Raji* и эритроциты, выделенные из крови крысы.

Результаты и обсуждение

Экспериментально установлено, что проксанол, как –268, так и –168 в процессе эмульгирования связывается с перфторуглеродами приблизительно на 1/3, остальная же часть находится в свободном состоянии и непосредственно взаимодействует как в виде мицелл, так и в виде молекул с биологическими мембранами своей гидрофобной площадкой, т.е. полиоксипропиленовым ПОПР–блоком.

Зарубежный эмульгатор – плуроник *F-68* – имел величину ПОПР–блока 21%, а отечественные проксанолы: 168 №24 – 16%; 168 №38 – 19%. Такое варьирование относительного содержания гидрофобного блока от 16 до 21 %, как показали наши исследования, может быть далеко не безразличным для биологических систем. Если расположить в ряд рассмотренные полимеры (*F-68*, П-168 №24, П-168 №38) по абсолютной величине гидрофобного блока, а не по относительной, с учетом молекулярной массы, то получим следующую картину: плуроник *F-68* с Mw – 8300 Д имеет ПОПР–блок 1743 Д; проксанол-168 №24 с Mw 8000 Д имеет ПОПР–блок 1280 Д; проксанол-168 №38 с Mw 5700 Д имеет ПОПР–блок 1112 Д. Отчетливо прослеживается тенденция к снижению абсолютной величины гидрофобного блока по мере уменьшения величины молекулярной массы полимера. Анализ полученных в эксперименте данных позволяет предположить, что биологическая активность проксанола зависит от абсолютной величины гидрофобного блока (табл. 1). Чем больше ПОПР–блок, тем сильнее детергентные свойства проксанола и тем лучше он эмульгирует, и, соответственно, чем меньше абсолютная величина ПОПР–блока, тем НПРАВ «мягче» действует на мембраны клеток, но стабильность таких эмульсий ухудшается. Кроме того, токсичность проксанолов зависит от содержания реакционных (гидразонактивных)

групп. Так, после очистки технических образцов проксанолов их токсичность, исследуемая с помощью ЛД₅₀ (табл. 2) и на культуре клеток *Raji* (табл. 3) уменьшается.

Экспериментальные данные показали, что чистота НПРАВ влияет на свойства эмульсий. Все нежелательные эффекты плуроника *F-68* и проксанола-268 можно ликвидировать или уменьшить очисткой активированным углем или фракционированием. Очищенные проксанол-268 или плуроник *F-68* мало токсичны и хорошо выводятся из организма. Очистку проводят древесным углем, но даже простая фильтрация через фильтры ø 0,22 мкм приводила к улучшению качества эмульгатора. Известно, что плуроник *F-68* не вызывает гемолиза эритроцитов и даже может выполнять роль мягкого антикоагулянта и онкотического агента.

Поскольку при внутривенном введении перфторуглеродных эмульсий, эмульгированных проксанолом, происходит непосредственный и достаточно долгий их контакт с красными клетками крови, представлялось важным проверить влияние отечественного проксанола-268 на гемолиз эритроцитов.

Исследования были проведены на осмотической модели деструкции эритроцитов, выделенных из крови крысы.

Повышение резистентности эритроцитов проксанолом

Осмотический гемолиз. Исследования показали, что проксанол в концентрации 0,1 % не оказывает заметного влияния на осмотическую резистентность эритроцитов на всем интервале гипотонии от 0,46 до 0,36 %. Гипотонические растворы натрия хлорида (0,46%; 0,44%; 0,42%; 0,40%; 0,38%; 0,36%) готовились с различными концентрациями проксанола-268: 0,1 %; 0,5 %; 1,0 %; 5 %; 10 %.

При увеличении концентрации проксанола до 0,5 % в гипотоническом растворе уже наблюдаются достоверные различия с контрольной кривой гемолиза эритроцитов. Максимальное снижение распада эритроцитов на 11 % происходит в гипотонических растворах с концентрациями 0,40 и 0,38 %, гемолиз снижается с 48 до 37 % и с 64 до 53 % соответственно. При концентрации 0,46 % распад уменьшается с 11 до 7 %, а на 0,44 %-ном растворе натрия хлорида – с 21 до 11 % (во всех случаях различия достоверны, $p < 0,05$). Достоверные отличия отсутствуют лишь в точке с максимальной гипотонией – 0,36 % ($p > 0,05$).

Защитный эффект 1%-ного проксанола проявился для его 1 %-ных растворов в 0,46 %-; 0,44 %- и 0,42%-ных гипотонических растворах. Снижение гемолиза эритроцитов в этих растворах достоверно ниже, чем в контроле на 11; 13; 18% соответственно. Достоверные отличия отсутствуют в p -рах с 0,40 %-ной и 0,36 %-ной концентрацией хлорида натрия, хотя средний распад эритроцитов на каждой гипотонии меньше, чем в контроле. Несколько иной характер носят кривые гемолиза для 5 %-ного и 10 %-ного растворов проксанола в гипотонических растворах. При обеих концентрациях ярко выражен антигемолитический эффект (рис. 1-2). На интервале используемых в эксперименте гипотонических растворов распад эритроцитов в присутствии проксанола практически отсутствует или очень незначителен. На графике с 10 %-ным проксанолом изображен начальный этап контрольного гемолиза эритроцитов. Это связано с тем, что для компенсации осмотичности 10 %-ного проксанола в гипотонические растворы (не содержащие НПРАВ) добавлялось эквивалентное количество сахарозы (0,46%), вследствие чего несколько увеличилась осмотичность растворов и произошло смещение кривой.

Таблица 1

Некоторые физико-химические и биологические свойства неионогенных поверхностно-активных веществ

Проксанол	Молекулярная масса, Д	Содержание реакционных групп, М/М	Содержание ПОПР блока, %	ЛД ₅₀ мыши, г/кг
П-168 №38	5700	0,24	19,0	24,0
П-268 №35	7200	0,48	19,5	15,0
П-268 №1	8000	0,20	19,0	14,2
Плюроник F-68 («Serva»)	8300	0,20	21,0	9,4

Таблица 2

Физико-химические и биологические свойства проксанола после очистки

Проксанол	Молекулярная масса, Д	Содержание реакционных групп, М/М	ЛД ₅₀ (токсичность) у мышей, г/кг
П-268 № 35 технический	7000	0,48	15,0
П-268 № 35 очищенный	7000	0,27	20,0

Таблица 3

Токсичность проксанола, определенная с помощью клеток *Raji*

Концентрация проксанола, %	Процент прироста клеток	
	Технический проксанол	Очищенный проксанол
0,1	62,0	100
0,5	10,0	91
1,0	1,3	80
1,5	1,0	75

Таблица 4

Характеристика технических и очищенных НПРАВ и их влияние на ЛД₅₀ у мышей, выживаемость крыс при 70 %-ном кровезамещении эмульсией на данных НПРАВ и жизнеспособность перфузируемого сердца кролика

ПРОКСАНОЛ (НПРАВ)	Содержание реакционных групп, М/М	Содержание ПОПР (%)	Температура помутнения, °С	Молекулярная масса, Д	ЛД ₅₀ мыши, г/кг	Выживание крыс, %	Время перфузии сердца, ч
Плюроник F-68	0,20	21	39	8300	9,4	0	6,2 0,4
Плюроник F-68 очищенный	0,20	20	39	—	12,7	80	6,6 0,2
П-268 № 35	0,48	19,5	41,5	7200	15,0	—	7,2 0,4
П-268 № 35 очищенный	0,27	19	41,5	—	20,0	100	8,0 0,2
П-168 № 1	0,90	25	—	8000	7,2	10–15	5,2 0,2
П-168 № 1 очищенный	0,90	20,5	—	—	12,3	100	6,5 0,2
П-168 № 38	0,24	19	48,3	5700	24,0	100	9,8 0,2
П-168 №38 очищенный	0,20	19	48,3	—	22,0	100	9,8 0,2

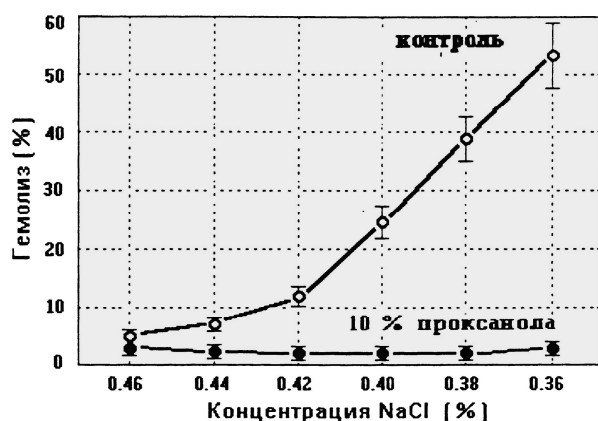


Рис. 1. Влияние на осмотический гемолиз эритроцитов 5 %-ного проксанола

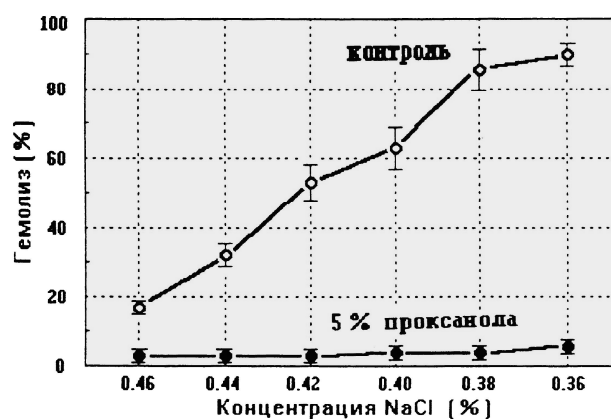


Рис. 2. Влияние на осмотический гемолиз эритроцитов 10 %-ного проксанола

Во II серии экспериментов была сделана попытка выяснить, как скажется предварительное взаимодействие проксанола с мембраной эритроцита на осмотический гемолиз клеток крови. Полученные экспериментальные данные показали, что достоверных отличий между контролем и опытом не наблюдалось. С увеличением количества адсорбированного проксанола и, по-видимому, с ростом структурного барьера, препятствующего проникновению гемолитика, повышается защитный эффект, уменьшая, таким образом, распад эритроцитов. При больших концентрациях проксанола и в случае многослойной адсорбции, полиоксидиленовые цепи начинают переплетаться между собой и, по-видимому, выдавливают связанную воду, значительно уменьшая, таким образом, гидратацию адсорбированного слоя и изолируя клетки от внешних воздействий. С этим явлением, вероятно, связано ярко выраженное антигемолитическое действие проксанола при больших концентрациях (5 и 10 %). Таким образом, эмульгатор перфторсоединений отечественный проксанол-268, являясь выраженным детергентом, даже в больших концентрациях (превышающих его концентрацию в эмульсии) оказывает антигемолитическое действие на эритроциты крови. Это позволяет использовать данное соединение не только в виде эмульгатора, но и в качестве отдельного фармакологического препарата, как, например, при экстракорпоральном кровообращении во время операций на открытом сердце.

Кардиотропное действие проксанола

Свойства эмульсий, как известно, существенно зависят от структуры используемых НПАВ. Были исследованы отечественные и зарубежные препараты (проксанола-168 и -268 и плуроник F-68 фирмы «Серва») с разной степенью очистки активированным углем.

Исследовались блок-сополимеры технические и очищенные с разной молекулярной массой и соответственно с разной величиной ПОПР-блока в составе контрольного раствора Кребса-Гензелейта на перфузируемом сердце кролика. Исследуемый образец плуроника F-68 (неочищенный) с расчетной молекулярной массой 8300 Д имел фактическое содержание ПОПР-блока – 21 %, гидразонактивных групп, реагирующих с динитрофенилгидразином – 0,20 моль/моль сополимера, с температурой помутнения – 39 °С. ЛД₅₀ составляла 9,4 г/кг. При исследовании этого сополимера в качестве перфузата на изолированном сердце кролика время переживания (сокращения) миокарда на 3 % ($3,6 \times 10^{-3}$ М) плуронике F-68 в составе контрольного раствора Кребса-Гензелейта достигало в среднем $6,2 \pm 0,4$ ч, что достоверно не отличалось от времени переживания сердца, перфузируемого только контрольным раствором Кребса-Гензелейта ($5,7 \pm 0,2$ ч). После очистки данного проксанола с помощью активированного угля, относительное содержание ПОПР-блока, содержание гидразонактивных примесей и температура помутнения раствора оставались прежними, однако ЛД₅₀ у мышей и выживаемость крыс после 70 % ОЦК кровезамещения эмульсией, приготовленной на данном проксаноле повысились. При этом достоверных различий во времени переживания сердца по сравнению с неочищенным плуроником F-68 не наблюдалось (табл. 4). Отечественный проксанол-268 № 35 (неочищенный) с расчетной молекулярной массой 7500 Д имел относительное содержание ПОПР-блока 19,5 %. Содержание гидразонактивных групп в данном сополимере было 0,48 моль/моль сополимера. Температура помутнения составляла 41,5 °С. ЛД₅₀ у мышей на данном проксаноле была выше, чем у плуроника F-68. При этом время

переживания сердца с 3% (4×10^{-3} М) на проксаноле-268 составляло в среднем $7,2 \pm 0,4$ ч. После обработки активированным углем проксанола-268 № 35 содержание ПОПР-блока не изменилось, а концентрация гидразонактивных групп заметно снизилась. Температура помутнения 0,1%-ных НПАВ не изменилось. ЛД₅₀ еще более возросла. Выживаемость крыс после 70 %-ного кровезамещения на эмульсию с данным НПАВ составила 100 %. При этом, достоверных различий во времени переживания сердца с неочищенным и очищенным проксанолом-268 не наблюдалось. Однако переживание сердца в присутствии очищенного проксанола-268 было существенно выше, чем в контроле, где использовался один раствор Кребса-Гензелейта. Исследовался проксанол-168 №1 (неочищенный) с расчетной молекулярной массой 8000 Д. Данный проксанол имел более высокое содержание гидразонактивных примесей (90 моль/моль сополимера), чем другие образцы. Величина ПОПР-блока – 25 %. ЛД₅₀ – 7,2 г/кг, выживаемость крыс при 70 %-ном кровезамещении на эмульсию, стабилизатором которой был П-168 № 1 составляла 10–15 %. Время перфузии сердца с 3 % П-168 № 1 было $5,2 \pm 0,2$ ч. Очистка данного проксанола резко уменьшило величину ПОПР-блока, увеличило ЛД₅₀ и выживаемость крыс, а также время переживания изолированного сердца кролика. При этом содержание гидразонактивных примесей осталось без изменения. По этой же схеме исследовали проксанол-168 № 38 (неочищенный) с расчетной молекулярной массой 5700 Д. У этого блок-сополимера количество гидразонактивных примесей меньше, чем в образце неочищенного проксанола-268 и П-168 №1. Величина ПОПР-блока – 19 %. Температура помутнения была выше, чем у предыдущих сополимеров и достигала 48,3 °С. ЛД₅₀ была 24 г/кг. Выживаемость крыс после кровезамещения на эмульсию, в которой был П-168 № 38, составила 100 %. Время переживания сердца с 3%-ным ($5,2 \times 10^{-3}$ М) проксанолом-168 № 38 достоверно больше по сравнению с контрольным раствором или другими НПАВ. Очистка проксанола-168 № 38 активированным углем не изменила величину ПОПР и температуру помутнения. Содержание гидразонактивных примесей несколько снизилось. ЛД₅₀, выживаемость крыс после кровезамещения и время переживания сердца в группе с данным блок-сополимером достоверно не изменилось. Из всех исследуемых блок-сополимеров окиси этилена и пропилена наиболее приемлемым полимером для создания перфузионных эмульсий ПФОС является П-168 № 38, имеющий не более 19 % относительного содержания полиоксипропиленового блока с низкой величиной молекулярной массы. Другие блок-сополимеры оказались более токсичными, хотя содержание реакционных групп в них было аналогично таковому у проксанола-168 № 38 (технического). При этом величина полиоксипропиленового блока как в относительном, так и в абсолютном значении была выше. Варьирование относительного содержания ПОПР (гидрофобного) блока может быть безразлично для биологических систем. Так, уменьшение (после очистки) ПОПР-блока в проксаноле-168 № 1 с 25 до 20,5 увеличивает: ЛД₅₀ у мышей, выживаемость крыс после 70 %-ного кровезамещения на эмульсию, приготовленную на данном проксаноле, а также время переживания изолированного сердца кролика (р 0,05) (табл. 4). Очистка других проксанолов существенно не изменила относительного содержания ПОПР-блока. Оказалось, что при равном содержании реакционных примесей (например, у НПАВ-168 № 38 – 0,20 М/М и плуроника F-68 – 0,20 М/М) и почти равном относительном содержании ПОПР-блока (20 и 19 % соответственно), время переживания изолированного сердца возрастало с ростом их гидрофильности по мере уменьшения абсолютных величин молекулярной массы.

Таким образом, очистка поверхностно-активных веществ с помощью активированного угля снижает токсичность более гидрофобных эмульгаторов, чем проксанолы с меньшим относительным содержанием полиоксипропиленового блока. Наименее токсичным эмульгатором для перфторуглеродных сред оказался проксанол-168 № 38 с низкой абсолютной величиной гидрофобного блока и, соответственно, с наименьшим ингибирующим действием.

Инотропные свойства проксанола

Как уже отмечалось, проксанол в больших концентрациях (10^{-3} М) обратно угнетает кальциевый ток сердечных клеток. При этом экспериментально нами было зарегистрировано 2 фазы инотропной реакции на фрагментах миокарда кролика при действии проксанола в концентрации 10^{-3} М (первая, кратковременная, фаза положительной инотропии и последующая, медленно развивающаяся, фаза угнетения сократимости). Эти две фазы коррелируют с двухфазным изменением максимальной величины кальциевого тока: кардиостимуляционный эффект сопровождается увеличением, депрессирующий – угнетением кальциевого тока. В наших экспериментах добавление проксанола-268 в концентрации 3 % (10^{-3}) вызывало подавление амплитуды сокращения перфузируемого раствором Кребса-Гензелейта сердца кролика на $18,1 \pm 0,5$ %. Отрицательный инотропный эффект развивался быстро и достигал максимума в течение 5 мин. При отмывке проксанола контрольным раствором Кребса-Гензелейта амплитуда сокращения восстанавливалась почти полностью. Такой же эффект наблюдался при изометрическом сокращении папиллярной мышцы сердца кролика, где добавление 3% проксанола-268 в раствор Кребса-Гензелейта подавляло сокращение на 40 ± 7 %, которое через 25–40 мин. реперфузии восстанавливалось полностью. Из полученных данных следует, что проксанол в больших концентрациях обладает выраженной отрицательной инотропией, связанной, по-видимому, с угнетением кальциевого тока. При уменьшении концентрации проксанола-268 в перфузате до 10^{-5} М, наоборот, наблюдалась положительная инотропия перфузируемого изолированного сердца. Увеличение амплитуды сокращения изолированного сердца достигало в среднем $18 \pm 0,6$ %. В присутствии адреноблокатора (10^{-6} М) проксанол не вызывал такой положительной инотропии. Проксанол-268 при данной концентрации (10^{-5} М) увеличивал в среднем на $20 \pm 1,2$ % величину изометрического сокращения папиллярной мышцы сердца кролика.

Проксанолы обладают выраженными кардиотропными эффектами, как на фрагментах мышцы сердца, так и на целом органе. Необходимо отметить, что 3%-ный проксанол-268 – как один, так и в составе эмульсии, ослабляет инотропное действие адреналина в концентрации 10^{-12} – 10^{-6} М. На фоне эмульсии перфторуглеродов, эмульгированной проксанолом-268, воздействие адреналина в указанных концентрациях оказывало незначительное влияние на амплитуду сокращения сердца, на фоне проксанола амплитуда возросла на 6–8 %, в то время как в контроле на растворе Кребса-Гензелейта амплитуда увеличилась на 14–15 %.

Кардиостимуляционный эффект полимера сопровождается увеличением входящего кальциевого тока. Кардиодепрессивные эффекты проксанола проявляются в концентрации 10^{-3} М и определяются, по-видимому, взаимодействием с клеточной мембраной сложных мицеллярных форм проксанола. В результате, очевидно, может уменьшиться чувствительность мио-

карда к эндогенным медиаторам и происходить снижение кальциевого тока. Измерение кальциевого тока при отрицательной инотропии, действительно, показало угнетение последнего под влиянием проксанола. Проксанолы характеризуются низкой константой мицеллообразования (10^{-4} , 10^{-5} М), которая уменьшается в присутствии электролитов. При последовательном повышении концентрации НПАВ из отдельных молекул вначале образуются глобулярные, а затем пластинчатые, дисковидные и цилиндрические мицеллы. Проксанолы обладают выраженными кардиотропными эффектами, как на фрагментах миокарда, так и на целом органе. Необходимо отметить, что 3%-ный проксанол-268, как один, так и в составе эмульсии, ослабляет инотропное действие адреналина в концентрации 10^{-12} – 10^{-6} М. На фоне эмульсии перфторуглеродов, эмульгированной проксанолом-268, воздействие адреналина в указанных концентрациях оказывало незначительное влияние на амплитуду сокращения сердца, на фоне проксанола амплитуда возросла на 6–8 %, в то время как в контроле на растворе Кребса-Гензелейта амплитуда увеличилась на 14–15 %. Положительное кардиотропное действие проксанола, по-видимому, связано с действием его мономерной формы. Важным моментом противоишемического эффекта проксанола и эмульсии является снижение под их влиянием положительного инотропного действия физиологических концентраций катехоламинов на изолированном сердце. В основе этого антиадреноргического эффекта проксанола, как и многих органических кальциевых антагонистов, по-видимому, лежит постсинаптическое угнетение трансмембранного кальциевого тока, возможно, за счет прямого взаимодействия компонентов эмульсии с рецепторами кальциевых каналов и модификации их воротного механизма.

Заключение

Проведенные исследования позволяют утверждать, что антигемолитическое действие проксанола имеет ярко выраженный характер и связано с присутствием поверхностно-активного вещества только в среде в ходе гемолиза эритроцитов, так как предварительная инкубация не оказывает защитного эффекта на процесс распада. Следовательно, снижение гемолиза эритроцитов, по-видимому, связано с адсорбцией проксанола на мембране эритроцитов, который структурирует воду и образует структурный «вязкий» барьер, препятствующий диффузии гемолитика. Интенсивная очистка поверхностно-активных веществ с помощью активированного угля снижает токсичность более гидрофобных эмульгаторов, чем проксанолов с меньшим относительным содержанием полиоксипропиленового блока. Наименее токсичным эмульгатором для перфторуглеродных сред оказался проксанол с низкой абсолютной величиной гидрофобного блока и, соответственно, с наименьшим ингибирующим действием. Результаты настоящего исследования выявили как положительное, так и отрицательное кардиотропное действие проксанола, в зависимости от концентрации блок-сополимеров. При действии проксанола в очень низких концентрациях порядка 10^{-5} М, как на целом сердце, так и на изолированной папиллярной мышце, проявляется положительная инотропия. Этот эффект устраняется адреноблокатором пропранололом, «чувствительность» к адреноблокатору фазы положительной инотропии указывает на ее пресинаптическое происхождение и на влияние проксанола в данной концентрации на выброс эндогенных катехоламинов.

Литература

1. Воробьев С.И., Ладиков Ю.В., Попов Л.А. и др. Влияние химически инертных перфторсоединений (в составе эмульсии) на первичную амплитуду сердечных сокращений // Вестник АМН СССР. – 1991. – № 6. – С. 61–4.
2. Воробьев С.И., Иваницкий Г.Р., Моисеенко О.М., Лебединская О.В. Комплемент активирующее действие перфторуглеродных эмульсий // Биосовместимость. – 1995. – Том 3, №1–2. – С. 51–62.

Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции

«Отечественные противоопухолевые препараты»

С.М. Адекенов¹, А.Ю. Барышников², М.В. Огородникова², Д.В. Соколова², С.Б. Ахметова¹,
А.Ж. Турмухамбетов¹, Р.И. Джалмаханбетова¹

ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ НА АПОПТОЗ КЛЕТОК

¹АО «Научно-производственный центр «Фитохимия», Караганда, Казахстан

²РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва

Цель исследования. Изучение влияния восьми образцов веществ растительного происхождения и их химически модифицированных производных метилйодида диметиламиноарглабина, N-оксид гармина и гидрохлорида гармина на апоптоз опухолевых клеток линии Т-клеточного лейкоза человека-Jurkat, В-клеточного лейкоза человека-Raji, моноцитарной лимфомы человека-U937 с применением современного метода регистрации апоптоза.

Материалы и методы. Клеточные линии выращивали в плотной питательной среде RPMI-1640, клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом. Оценку цитотоксического действия соединений проводили методом MMT. Определение активной каспазы-3 – маркера ранней стадии апоптоза опухолевых клеток линий Jurkat, Raji, U937 проводили после инкубации с химиопрепаратами с использованием коммерческого набора FITC-Conjugated monoclonal active caspase-3 antibody apoptosis Kit. Контролем служили интактные клетки, которые инкубировали в отсутствие исследуемых веществ, анализ проб проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur.

Результаты. При определении активной каспазы-3, маркера ранней стадии апоптоза опухолевых клеток линий Т-клеточного лейкоза человека Jurkat, в течение 72 ч количество апоптотических клеток для метилйодида диметиламиноарглабина составило от 12 %, с увеличением концентрации до максимальной дозы популяция клеток активных по каспазе-3 увеличивается до 40 %. Количество апоптотических клеток для гидрохлорида гармина составило 13 % и 65,3 % соответственно для данных концентраций. Для В-клеточного лейкоза человека Raji сравнительное увеличение популяции клеток положительных по каспазе-3 наблюдается для метилйодида диметиламиноарглабина и составляет 87 %, для моноцитарной лимфомы человека-U937 значительно увеличивается и составляет для метилйодида диметиламиноарглабина 91,6 %, для N-оксид гармина – 59,6 %, для гидрохлорида гармина – 90 %.

Выводы. Таким образом, в результате проведенного исследования впервые установлена цитотоксическая активность метилйодида диметиламиноарглабина, N-оксида гармина, гидрохлорида гармина в отношении опухолевых клеток линий Jurkat, Raji, U937, изученные образцы производных природных соединений вызывают гибель опухолевых клеток по типу апоптоза.

Т.Г. Боровская, В.Е. Гольдберг, О.А. Румпель, А.В. Перова, А.В. Пахомова, Е.Д. Гольдберг

ВЛИЯНИЕ ПАКЛИТАКСЕЛА НА РЕПРОДУКТИВНУЮ СИСТЕМУ КРЫС-САМЦОВ

ГУ НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН, Томск

Задача исследования. Оценить состояние репродуктивной системы крыс-самцов в ранние и отдаленные сроки после введения противоопухолевого препарата паклитаксела.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 80 крысах-самцах популяции Вистар репродуктивного возраста. Паклитаксел (митотакс, Dr. Reddy's, Индия) вводили однократно внутривенно в МПД (7,6 мг/кг), контрольные животные (n=30) получали соответствующий растворитель. С целью изучения повреждающего действия препарата на гонациты всех стадий развития оценка состояния репродуктивной системы крыс-самцов проводилась на 1–7, 16–22, 36–42, 90–96 и 180–186 сут после введения препарата. Определяли индекс плодовитости (ИП); индекс беременности (ИБ); общее количество сперматозоидов, приходящихся на эпидидимис (ОКС); процент их подвижных форм (ППФ); у интактных самок, скрещенных с самцами, – эмбриональную смертность. Статистическую обработку проводили по критериям Вилкоксона-Манна-Уитни и угловому преобразованию Фишера.

Результаты. Установлено, что снижение ИП крыс-самцов выявлялось с 1–6 сут опыта, что может быть связано с угнетением полового инстинкта животных в результате нейротоксичности паклитаксела. Частичное бесплодие (у 18–37 %) крыс, снижение ОКС, ППФ (на 29–54 %, 26–44 % соответственно) наблюдалось в сроки, соответствующие воздействию на все стадии созревания клеток (до 3 мес после начала опыта). Следует отметить, что стерилизующий эффект паклитаксела носил обратимый характер и к концу опыта ИБ не отличался от контрольных значений. При этом количество ОКС и ППФ в сравниваемых группах было сходным. В связи с этим снижение эффективности спаривания, очевидно, связано с олигоспермией и угнетением функциональной активности половых клеток. С учетом сроков проявления эффектов паклитаксел повреждает как делящиеся, так и неделящиеся гонациты. У крыс-самок, скрещенных с самцами опытной группы, было выявлено достоверное возрастание эмбриональной смертности (пре- и постимплантационной) на стадиях сперматозоидов и сперматогоний, что может быть результатом снижения оплодотворяющей способности спермиев и индукции доминантных летальных мутаций. Через 6 мес после начала опыта эмбриональная гибель оставалась повышенной.

Вывод. Таким образом, паклитаксел снижает репродуктивный потенциал крыс-самцов, повреждая гонациты всех типов. Стерилизующее действие препарата носит обратимый характер, но возможность сохранения беременности с течением времени остается сниженной.

УДК 616.36-006.6:576.385.5

*М.В. Макарова, Н.Е. Доннер, Д.И. Флейшман, О.В. Морозова, Н.Л. Лазаревич***ЧАСТИЧНАЯ РЕВЕРСИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ФЕНОТИПА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ИНАКТИВАЦИЕЙ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА $\beta 2$**

РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация:

Макарова Мария Викторовна, научный сотрудник лаборатории механизмов прогрессии эпителиальных опухолей НИИ канцерогенеза.

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(495)324-14-10

e-mail: mariyamakarova@inbox.ru

Статья поступила: 27.05.2009 г., принята к печати: 23.09.2009 г.

Резюме

Трансформирующие факторы роста (*TGF β*) являются важными цитокинами, участвующими в развитии гепатоцеллюлярных карцином. Повышенный уровень *TGF β* в плазме крови и моче пациентов свидетельствует о прогрессии заболевания. В то время как влияние *TGF $\beta 1$* на процессы пролиферации, апоптоза и дифференцировки гепатоцитов активно исследуется, возможная роль *TGF $\beta 2$* в гепатоканцерогенезе практически не изучена. Для того чтобы исследовать роль гиперэкспрессии *TGF $\beta 2$* в развитии злокачественного фенотипа ГК, мы использовали экспериментальную модель одноступенчатой прогрессии ГК мышей, которая состоит из медленно растущей дифференцированной ГК и выщипывшегося из нее *in vivo* при подкожной перевивке быстрорастущего дедифференцированного варианта. Это модель характеризуется тем, что прогрессия ГК сопровождалась повышением экспрессии гена *TGF $\beta 2$* . Подавляя синтез *TGF $\beta 2$* в культуре клеток, полученной из быстрорастущей ГК, с помощью малых интерферирующих РНК, мы предполагали оценить вклад *TGF $\beta 2$* в развитие злокачественного фенотипа. Снижение продукции *TGF $\beta 2$* привело к реактивации утраченной в ГК экспрессии транскрипционных факторов *HNF4* и *C/EBP*, которые играют важную роль в установлении и поддержании дифференцированного фенотипа гепатоцитов. Более того, при подавлении синтеза *TGF $\beta 2$* произошло снижение скорости пролиферации и подвижности клеток линии дедифференцированной ГК.

Ключевые слова: гепатоцеллюлярная карцинома, дифференцировка, трансформирующий фактор роста (*TGF β*).*M.V. Makarova, N.E. Donner, D.I. Fleishman, O.V. Morozova, N.L. Lazarevich***THE PARTIAL REVERSION OF HEPATOCYTES' MALIGNANT PHENOTYPE BY INACTIVATION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR $\beta 2$**

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

Abstract

Transforming Growth Factors β (TGF β) are the main cytokines participating at the development of hepatocellular carcinoma. The high level of TGF β plasma and urine is the first sign of the disease. The involvement of *TGF $\beta 1$* cell proliferation, apoptosis and differentiation is well documented. Here we focused on the possible role of *TGF $\beta 2$* hepatocarcinogenesis. To study the role of *TGF $\beta 2$* overexpression on the development of malignant hepatocarcinoma, we used the experimental one-step animal model. This model is characterized by high expression of *TGF $\beta 2$* experimental tumor. Using si-RNA technology to reduce the expression of *TGF $\beta 2$* hepatocytes derived from fast growing hepatocellular carcinomas. The reducing of *TGF $\beta 2$* expression results in reaction of transcriptional factor such as *HNF4* and *C/EBP* participating at the differentiation of hepatocytes. Moreover, the blockade of *TGF $\beta 2$* expression reduces the proliferative rate and migration of cells.

Key words: hepatocellular carcinoma, differentiation, *TGF β* .**Введение**

Гепатокарцинома является пятой по распространенности и третьей по уровню смертности опухолью в мире [21]. Интенсивные эпидемиологические исследования последних лет позволили идентифицировать множество факторов риска возникновения ГК. Однако ключевые молекулярные механизмы, лежащие в основе гепатоканцерогенеза, остаются недостаточно изученными.

В ходе прогрессии ГК происходят изменения активности внутриклеточных сигнальных каскадов и нарушения программы экспрессии гепатоспецифических генов.

Одними из основных молекулярных изменений сигнальных путей, идентифицированных для ГК человека, являются нарушения активности Wnt/ β -ка-

тенин сигнального пути, *p53*, *MAPK*, *JAK/STAT*, *Ras* и *TGF $\beta 2$* —сигнального каскада [6]. *TGF β* является плейотропным цитокином, контролирующим различные свойства клеток организма, такие как пролиферация, подвижность, адгезия и дифференцировка опухолевых клеток. Генетические изменения компонентов *TGF β* —сигнального каскада описаны для опухолей различного происхождения, но его роль в канцерогенезе противоречива, так как *TGF β* в зависимости от клеточного контекста может проявлять либо свойства опухолевого супрессора, либо онкогенные черты.

Считается, что в нормальных клетках и на ранних этапах развития эпителиальных опухолей *TGF β* подавляет пролиферацию и индуцирует апоптоз, однако на более поздних стадиях прогрессии он индуцирует эпителиально-мезенхимальный переход, усиливает инвазию и метастазирование [20].

Роль *TGF β* в возникновении и развитии ГК также неоднозначна и недостаточно изучена. *TGF β1* является значимым ингибитором пролиферации нормальных гепатоцитов. При повреждении печени *TGF β1* сигнальный каскад активируется, останавливая рост регенерирующих гепатоцитов [7]. С другой стороны, у пациентов с ГК уровень *TGF β1* в плазме крови и моче повышен [25; 11]. Иммуногистохимическими методами было показано, что *TGF β1* продуцируется в более чем 40 % исследованных образцов ГК [5].

У млекопитающих выявлены три белка семейства *TGF β* ($\beta 1$; $\beta 2$ и $\beta 3$), которые высоко гомологичны по аминокислотной последовательности. Однако при инактивации генов *TGF β* наблюдаются непохожие эффекты, что, по-видимому, свидетельствует о функциональном различии изоформ *TGF β* [19]. Большинство исследований, проводимых на гепатоцитах, посвящено изучению роли *TGF β1*, однако наши результаты свидетельствуют о том, что активация *TGF β*-сигнального пути при прогрессии гепатокарцином может происходить за счет усиления транскрипции гена *TGF β2*.

Ранее нами была получена и охарактеризована модель одноступенчатой прогрессии ГК, которая состоит из медленно растущей высокодифференцированной ГК мыши и одномоментно выщипавшегося из нее *in vivo* при подкожной перевивке быстрорастущего дедифференцированного варианта. В ходе прогрессии бГК приобрела ряд свойств, отличающих ее от мГК: резкое увеличение скорости роста *in vivo*, способность расти *in vitro*, снижение экспрессии дифференцировочных маркеров и изменение морфологических характеристик [18].

При прогрессии от мГК к бГК произошло кординированное падение уровней экспрессии целого блока транскрипционных факторов, влияющих на установление и поддержание гепатоцитарного фенотипа. Самой вероятной причиной по крайней мере некоторых фенотипических изменений, произошедших в ходе прогрессии, является нарушение функции гепатоцитарного ядерного фактора *HNF4α*, снижение экспрессии которого по сравнению с нормальной печенью было описано ранее в ГК мыши [17] и крысы [13], а также в культурах дедифференцированных гепатом [24]. Экзогенная экспрессия *HNF4 1* в культуре клеток бГК привела к частичной реверсии злокачественного фенотипа и снижению скорости пролиферации опухолевых клеток [18]. При сравнении спектров экспрессии генов в мГК, бГК, культуре бГК и нормальной печени мыши методом гибридизации с микрочипами, содержащими кДНК 9000 генов, было показано, что существенная часть генов, активировавшихся в ходе прогрессии от мГК к бГК, оказались *TGF β* – индуцируемыми, что указывает на вовлеченность этого сигнального пути в прогрессию опухолей печени [2]. Анализ экспрессии двух изоформ *TGF β* ($\beta 1$ и $\beta 2$) в панели химически индуцированных ГК мыши независимого происхождения и разного уровня дифференцировки показал, что дедифференцировка сопровождается гиперэкспрессией именно *TGF β2*, уровень экспрессии *TGF β1* повышен по сравнению с нормальной печенью в образцах ГК различного уровня дифференцировки [4]. Основываясь на этих данных, мы решили проверить, изменилась ли экспрессия *TGF β2* при одноступенчатой прогрессии ГК мыши, и оценить вклад этого фактора в развитие злокачественного фенотипа дедифференцированной ГК с помощью подавления продукции *TGF β2* в культуре клеток H33, которая была получена из бГК.

Материалы и методы

Культивирование клеточных линий

Культуру клеток быстрорастущей низкодифференцированной ГК, H33 [1] и линию пакующих клеток HEK293T культивировали в среде DMEM (HyClone) с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone), глутамина (300 мкг/мл, ПанЭко) и антибиотика ципрофлоксацина (10 мкг/мл) в атмосфере 5 %-ного CO₂ при постоянно поддерживаемой в термостате температуре 37 °C.

Получение лентивирусов

Клетки HEK293T рассевали в количестве 1 · 10⁶ на 6 сантиметровые чашки и через 6 часов проводили трансфекцию смесью из четырех векторов, три из которых кодировали структурные и функциональные белки лентивируса (pLP1, pLP2, pLP/VSVG, Invitrogen), а четвертый экспрессировал миРНК к *TGF β2*.

Лентивирусный вектор pLSL-puro, содержащий ген устойчивости к пурамицину, в который были клонированы последовательности, кодирующие малые интерферирующие РНК (миРНК) к гену *TGF β2*, был любезно предоставлен проф. П.М. Чумаковым (ИМБ РАН). Последовательности миРНК 5'-TTATAGTTTTCTGATCACC-3' (ми *TGF β2-1*) и 5'-ATTAGCAGGAGATGTGGGG-3' (ми *TGF β2-2*), кодирующие миРНК к гену *TGF β2*, были синтезированы и клонированы в вектор pLSL-puro, полученные конструкции были проверены секвенированием. В качестве контрольной культуры были использованы клетки H33, инфицированные тем же вектором, не содержащим миРНК (*H33-pLSL-puro*).

Трансфекцию проводили стандартным кальций-фосфатным методом. Собранную с клеток HEK293T культуральную среду, содержащую вирусные частицы, центрифугировали, фильтровали и использовали для инфекции клеток H33 в течение 3 дней. Через 24 ч после последнего добавления вируса в культуральную среду добавляли антибиотик пурамицин (в концентрации 3 мкг/мл) и проводили селекцию в течение 5 дней. Контрольные нетрансфицированные клетки H33 погибали в течение 3–4 дней.

Выделение РНК

Суммарную клеточную РНК из образцов тканей и опухолей мышей или из культур клеток выделяли с помощью набора для выделения РНК «Wizard SV Total RNA Isolation System» (Promega) в соответствии с рекомендациями производителя. Ткани предварительно измельчали в парах жидкого азота в охлажденном гомогенизаторе Поттера. Качество полученной РНК определяли с помощью электрофореза в агарозном геле, концентрацию измеряли спектрофотометрически.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ)

С полученных препаратов РНК ставили реакцию ОТ: 3 мкг РНК смешивали с 0,1 мкг случайных гексамерных олигонуклеотидов (Синтол), денатурировали при 65 °C и охлаждали на льду, затем добавляли ОТ-смесь (2 ед. обратной транскриптазы MMLV (Promega), соответствующий буфер, 2 мМ дитиотриглицерол, 0,5 ед. ингибитора рибонуклеаз и смесь дезокси-нуклеотид-трифосфатов, по 0,5 мМ каждого) и проводили реакцию ОТ при 42 °C 30 мин.

Реакцию останавливали инактивацией ревертазы при 94 °C 5 мин и доводили объем смеси до 100 мкл.

В состав ПЦР смеси входили: 1 мкл рабочего раствора специфических праймеров (0,5 мкМ) к соответствующим генам [18], 2,5 ед. Tag-полимеразы (Биомастер, 10000 ед/мкл), 2,5 мкл 10X Tag-буфера без $MgCl_2$ (Биомастер), 2,5 мМ $MgCl_2$, 250 мкг/мкл каждого из ДНФ, 5 мкл смеси, полученной после ОТ, H_2O до конечного объема 25 мкл. Для проведения ОТ-ПЦР использовали амплификатор T3 Thermocycler (Biometra). Проводили первичную полную денатурацию (94 °С, 3 мин), каждый из ПЦР циклов включал этапы денатурации (94 °С, 50 сек), отжига праймеров (1 мин) и элонгации (72 °С, 1 мин); по окончании реакции проводили полное достраивание продукта (72 °С, 10 мин). Последовательности и температуры отжига праймеров доступны по запросу. Далее продукты ПЦР подвергали электрофоретическому разделению в 1,5 % агарозном геле, результаты документировали с помощью фотодокументирующей системы гелей DIGI DOC-IT (UVP). Для контроля равенства количества РНК, взятой в реакцию, проводили ОТ-ПЦР с праймерами к GAPDH (глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа). Для проверки достоверности результатов ОТ-ПЦР повторяли трижды.

Определение количества *TGF β2*

Для определения концентрации *TGF β2* в кондиционированной среде использовали набор для иммуноферментного анализа (ИФА) – DuoSet ELISA Development kit *TGF β2* (R&D Systems, USA).

Не менее $2 \cdot 10^6$ клеток культуры H33 высевали на 6 см чашку и культивировали в течение 48 часов, среду собирали, центрифугировали 10 мин при 5 000 об/мин, измеряли объем и фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева.

Количество активного и общего *TGF β2* в пробах измеряли в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Оптическую плотность при длине волны 450 нм измеряли с помощью планшетного ридера «Униплан» (Пикон, Россия). Полученные значения нормализовывали по количеству клеток в 1 мл среды.

Определение скорости пролиферации

Для определения скорости пролиферации использовали метод определения включения модифицированного нуклеотида – 5-бромдезоксимуридина (5-BrdU) в ДНК, с последующей иммунофлуоресцентной окраской специфическими моноклональными антителами к модифицированному нуклеотиду.

$1,5 \cdot 10^5$ клеток высевали на 3 см чашку, на следующий день добавляли 10 мкМ 5-BrdU (Sigma) на 2 часа и инкубировали при 5% CO_2 и 37 °С. Препараты промывали 3–4 раза забуференным физиологическим раствором и фиксировали холодным метанолом при –20 °С в течение 20 мин. После фиксации клетки отмывали 3ФР в течение 10 мин, инкубировали в 4Н соляной кислоте в течение 10 мин и промывали 3ФР 3 раза по 5 мин. Затем проводили иммунофлуоресцентное окрашивание по стандартной методике. Моноклональные антитела мыши к 5-BrdU (ZymoResearch) использовали в разведении 1:200; антитела козы к IgG мыши с флуоресцентной меткой Alexa-Fluor 488 (Invitrogen) – в разведении 1/200.

Для подсчета окрашенных клеток использовали флуоресцентный микроскоп Axioptan 2 (Carl Zeiss). Уровень пролиферации определяли как отношение количества окрашенных клеток к общему количеству клеток в поле зрения. Для каждого препарата было подсчитано не менее 1000 клеток.

Определение подвижности клеток

В 24-луночную плашку помещали инвазионные камеры с порами размером 8 мкм (BD Biosciences). В лунку плашки добавляли 500 мкл среды с 5 %-ным содержанием сыворотки. В камеру добавляли суспензию, содержащую 1×10^5 клеток в бессывороточной среде и культивировали в течение 24 ч. Затем клетки, которые остались в верхней части камеры, тщательно удаляли с помощью ватных палочек, а клетки, проползшие через поры, окрашивали витальным красителем Cell Stain 20294 (Chemicon International). Общее количество мигрировавших клеток определяли как сумму клеток, которые проползли через поры и остались прикрепленными к нижней части камеры, и клеток, которые проползли и попали в лунку плашки. Подвижность клеток определяли как процентную долю общего количества мигрировавших клеток экспериментальной культуры по отношению к общему количеству таких клеток в контрольной культуре.

Результаты

Одноступенчатая прогрессия ГК сопровождается активацией экспрессии гена *TGF β2*

Для проверки предположения об активации экспрессии генов *TGF β1* и *TGF β2* в ходе прогрессии ГК уровни транскрипции этих генов были проанализированы в ряду нормальная печень, мГК, бГК и H33 методом ОТ-ПЦР (рис. 1). Уровень экспрессии гена *TGF β1* во всех опухолях превышал детектируемый в нормальной печени, однако в бГК и H33 по сравнению с мГК он практически не изменился. В то же время, в ходе прогрессии ГК была обнаружена значительная индукция транскрипции гена *TGF β2*.

В соответствии с полученными ранее результатами [18], параллельно с активацией экспрессии гена *TGF β2*, в бГК и H33 было выявлено значительное снижение уровня транскрипции гена *HNF4* (см. рис. 1), который играет ключевую роль в дифференцировке нормальных гепатоцитов в процессе эмбриогенеза и в поддержании гомеостаза нормальной печени во взрослом организме [3].

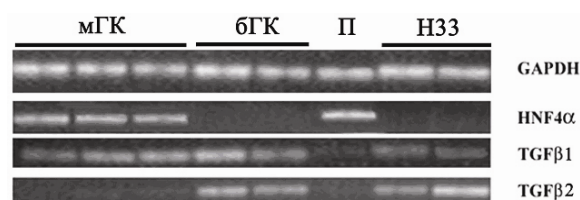


Рис. 1. Изменение экспрессии *HNF4*, *TGF β1* и *TGF β2* при одноступенчатой прогрессии ГК:

ОТ-ПЦР анализ уровней экспрессии мРНК в мГК, бГК, нормальной печени (П), культуре H33. Для контроля равенства количества РНК, взятой в реакцию, приведены результаты ОТ-ПЦР с праймерами к кДНК глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH).

Таким образом, наблюдающаяся в ходе одноступенчатой прогрессии ГК активация *TGF β*-сигнального пути могла быть вызвана активацией экспрессии *TGF β2*. Более того, снижение уровня дифференцировочного регулятора этого процесса для гепатоцитов – *HNF4α*, могло быть связано с гиперэкспрессией *TGF β2*. На следующем этапе работы мы решили проверить, какое влияние будет оказывать инактивация синтеза *TGF β2* на пролиферацию, подвижность и экспрессию *TGF β*-зависимых генов в культуре клеток H33.

Подавление продукции *TGF β2* в культуре дедифференцированной гепатокарциномы H33

Для выяснения возможной роли *TGF β2* в качестве фактора, индуцирующего прогрессию ГК, мы разработали систему для специфического подавления продукции *TGF β2* в культуре H33, полученной из дедифференцированной ГК.

Для этого были созданы лентивирусные экспрессирующие вектора, кодирующие малые интерферирующие РНК к гену *TGF β2*.

С помощью программы siRNA Scales (http://gesteland.genetics.utah.edu/siRNA_scales) нами были подобраны две последовательности, которые предположительно должны были эффективно подавлять продукцию *TGF β2* и не имели гомологии с кодируемыми последовательностями других генов этого семейства. Эти последовательности были синтезированы и клонированы в лентивирусный вектор pLSL-puro, содержащий ген устойчивости к пуromицину (pLSL-puro-ми *TGF β2-1* и pLSL-puro-ми *TGF β2-2*). Клетки H33 заражали лентивирусами, кодирующими последовательности миРНК к гену *TGF β2*, и проводили селекцию трансдуцированных клеток на пуromицине. В качестве контрольной культуры были использованы клетки H33, инфицированные тем же вектором, не содержащим миРНК (H33-pLSL-puro).

Уровни секреции белка *TGF β2* в клетках H33, трансформированных pLSL-puro-ми *TGF β2-1* (H33-ми *TGF β2-1*), pLSL-puro-ми *TGF β2-2* (H33-ми *TGF β2-2*), и в контрольной культуре H33-pLSL-puro определяли методом ИФА. Большая часть *TGF β2*, секретируемого клетками H33, связана с LAP-пептидом и не определяется методом ИФА. Однако при воздействии экстремальных значений pH связь между процессированным цитокином и LAP-пептидом разрушается, что позволяет определить общее содержание *TGF β2* в кондиционированной среде. На рис. 2 представлена диаграмма, которая отражает падение уровня продукции *TGF β2* в культурах, экспрессирующих миРНК *TGF β2*, в процентном отношении по сравнению с контрольной культурой H33-pLSL-puro.

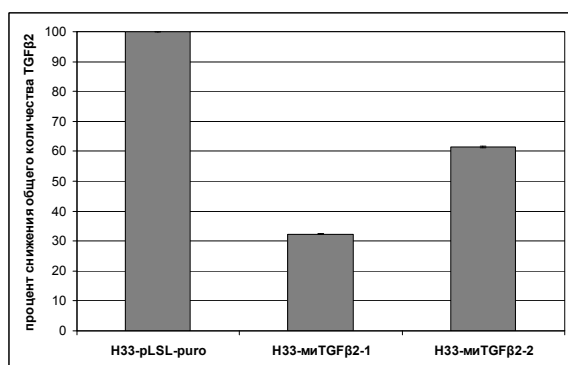


Рис. 2. Снижение количества *TGF β2* в кондиционированной среде H33-ми *TGF β2-1* и H33-ми *TGF β2-2*: Результаты определения общего количества *TGF β2* методом ИФА представлены в виде процентного соотношения между количеством *TGF β2*, секретируемого контрольной культурой, и количеством *TGF β2* в кондиционированной среде линий H33-ми *TGF β2-1* и H33-ми *TGF β2-2*.

Оказалось, что две последовательности миРНК в разной степени подавляют экспрессию *TGF β2*: в культуре H33-ми *TGF β2-1* регистрировалось примерно трехкратное снижение продукции по сравнению

с контролем, в то время как в культуре H33-ми *TGF β2-2* произошло подавление лишь в 1,5 раза. Эти данные согласуются с результатами ОТ-ПЦР со специфическими праймерами к гену *TGF β2* (рис. 3), демонстрирующими значительное снижение количества мРНК *TGF β2* в культурах H33-ми *TGF β2-1* и *β2-2* по сравнению с контрольными клетками. Необходимо отметить, что последовательности миРНК *TGF β2* были специфичны и не повлияли на уровень транскрипции гена *TGF β1* (см. рис. 3).

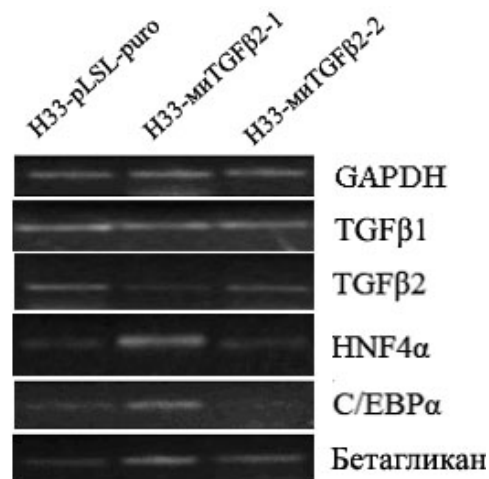


Рис. 3. Влияние подавления продукции *TGF β2* на экспрессию генов, регулирующих дифференцировку гепатоцитов, в клеточной линии H33:

Результаты ОТ-ПЦР: дорожка 1 – H33-pLSL-puro, дорожка 2, 3 – H33-ми *TGF β2-1* и H33-ми *TGF β2-2*, экспрессирующие миРНК к *TGF β2*. Для контроля равенства количества РНК, взятой в реакцию, приведены результаты ОТ-ПЦР с праймерами к GAPDH.

Таким образом, нам удалось разработать систему специфического подавления экспрессии *TGF β2* в клеточной линии дедифференцированной ГК H33.

Влияние снижения продукции *TGF β2* на экспрессию гепатоспецифических транскрипционных факторов

Как уже было отмечено выше, в ходе прогрессии в бГК произошло снижение экспрессии целого блока транскрипционных факторов, влияющих на установление и поддержание дифференцированного фенотипа гепатоцитов. Экзогенная реэкспрессия одного из них – *HNF4α*, привела к частичному восстановлению дифференцированного фенотипа клеточной линии H33 и повышению экспрессии других гепатоцитарных ядерных факторов и маркеров дифференцировки. Таким образом, нам представилось важным оценить возможное влияние снижения продукции *TGF β2* на экспрессию гена *HNF4* в культуре H33.

По данным ОТ-ПЦР, в линии H33-ми *TGF β2-1*, где продукция *TGF β2* максимально снижена по сравнению с контрольными клетками и клетками H33-ми *TGF β2-2*, произошла активация подавленной в исходной культуре транскрипции *HNF4α*. Кроме того, было выявлено повышение уровня экспрессии транскрипционного фактора *C/EBPα* и бетагликана (см. рис. 3). Бетагликан или рецептор *TGF βIII* типа (*T βRIII*) не имеет внутриклеточного киназного домена и, соответственно, не способен участвовать во внутриклеточной передаче сигнала, но принимает участие в активации и накоплении *TGF β* на поверхности клеток и модулирует его связывание с сигнальными рецепторами *T βRI* и *T βRII*.

Сниженная по сравнению с нормальными тканями экспрессия *T βRIII* или отсутствие таковой обнаружены в опухолях молочной железы, яичников, легких и поджелудочной железы, более того, это снижение коррелирует с гиперэкспрессией *TGF β* и со стадией прогрессии опухоли [10; 12; 16]. Обработка цитокином *TGF β1* клеточных линий, полученных из карцином молочной железы, яичников и поджелудочной железы приводит к падению экспрессии *T βRIII* [14]. Ряд авторов предполагают возможную противоопухолевую роль этого белка, так как он способен блокировать действие цитокинов семейства *TGF β* [10; 12; 16].

Невысокое, но достоверное восстановление экспрессии гена *HNF4* при подавлении продукции *TGF β2* в клетках дедифференцированной гепатомы H33, является важным результатом, указывающем на возможную роль активации гена *TGF β2* в прогрессии ГК. В предыдущих работах нашей лаборатории на различных системах, в том числе при анализе изменения уровней транскрипции генов опухолевых образцов ГК человека, было показано, что снижение экспрессии *HNF4α* определяет уровень дифференцировки опухолей и коррелирует со стадией прогрессии ГК [4]. Также было продемонстрировано, что в культуре H33 ген *HNF4α* инактивирован не за счет мутации или делеции, а за счет транскрипционной регуляции, предположительно – репрессором, который связывается с определенным районом в промоторе P1 этого гена.

В настоящей работе нами впервые показана возможность реактивации транскрипции эндогенного гена *HNF4α*, которая была вызвана подавлением продукции *TGF β2*. Вероятно, *TGF β2* активирует возможный репрессор, который и подавляет транскрипцию *HNF4α*.

Важно заметить, что в образцах ГК мыши описано также снижение экспрессии гена *C/EBPα*, вовлеченного в контроль дифференцировки и пролиферации гепатоцитов [15]. Резэкспрессия этого гена в клетках H33 при подавлении функции *TGF β2* также свидетельствует в пользу гипотезы о роли *TGF β2* как фактора, способствующего прогрессии ГК.

Подавление продукции *TGF β2* приводит к снижению скорости пролиферации клеток линии H33.

На различных модельных системах, в том числе в культурах клеток гепатоцитарного происхождения (*HuH7* и *HepG2*) было показано, что *HNF4α* может активировать транскрипцию *p21*, подавляя, таким образом, пролиферацию этих клеток [8]. Для фактора *C/EBPα* также предложено несколько возможных механизмов участия в контроле пролиферации в различных типах клеток [23].

Для оценки скорости пролиферации клеток H33 с подавленным синтезом *TGF β2* был использован метод включения 5-BrdU в ДНК. В контрольной культуре *H33-pLSL-puro* примерно 70 % клеток были окрашены, при подавлении синтеза *TGF β2* процент пролиферирующих клеток снизился до 55% в культуре H33-ми *TGF β2-1* и 60% в культуре H33-ми *TGF β2-2* (рис. 4).

Таким образом, подавление продукции *TGF β2* в культуре H33 привело к снижению скорости пролиферации клеток. Более того, уровень такого снижения коррелировал со степенью подавления продукции *TGF β2*, то есть в культуре, где миРНК *TGF β2* более эффективно подавили синтез *TGF β2*, замедление пролиферации оказалась более значительным по сравнению с линией H33-ми *TGF β2-2*, где экспрессировалась менее эффективная последовательность миРНК *TGF β2*.

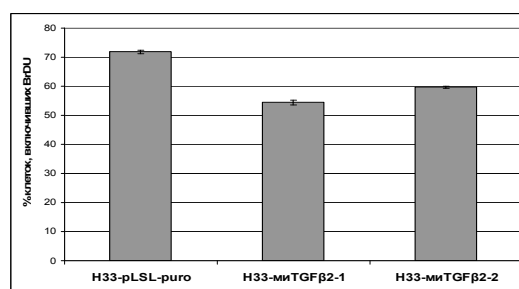


Рис. 4. Подавление продукции *TGF β2* в культуре H33 приводит к снижению скорости пролиферации клеток: Скорость пролиферации клеточных линий H33-pLSL-puro, H33-ми *TGF β2-1* и H33-ми *TGF β2-2*, определенная по включению модифицированного нуклеотида 5-BrdU в ДНК.

Вероятно, эффект подавления пролиферации может быть обусловлен как резэкспрессией *HNF4* и *C/EBP*, так и непосредственно подавлением продукции *TGF β2*, так как цитокины семейства *TGF β*, как было отмечено ранее, могут индуцировать клеточный цикл посредством различных механизмов [9; 22].

Подавление продукции *TGF β2* приводит к повышению подвижности клеток линии H33

Поскольку известно, что *TGF β1* участвует в регуляции инвазии и подвижности различных типов эпителиальных клеток [16], мы решили исследовать, влияет ли подавление продукции *TGF β2* на подвижность клеток дедифференцированной гепатомы H33. При постановке теста на определение клеточной подвижности мы использовали инвазионные камеры с мембранами, содержащими поры. В верхнюю часть камеры наливали среду без сыворотки с клетками, в лунку плашки помещали среду с 5%-ным содержанием сыворотки. Таким образом, клетки по градиенту концентрации сыворотки проползали через мембрану с порами 8 мкм. Через сутки клетки, которые остались на верхней стороне мембраны, удаляли, а клетки, которые проползли сквозь поры, окрашивали и подсчитывали. Мы обнаружили, что в культуре H33-ми *TGF β2-1*, где подавление *TGF β2* было наиболее значительным, произошло резкое снижение подвижности клеток: количество клеток, которое прошло через мембрану, было в 7 раз меньше аналогичного показателя для контрольной культуры H33 puro. Подвижность клеток культуры H33-ми *TGF β2-2* снизилась в 3 раза по сравнению с контролем (рис. 5).

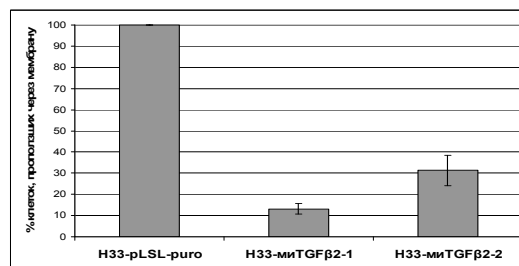


Рис. 5. Подавление продукции *TGF β2* в культуре H33 вызывает снижение подвижности клеток: Результаты представлены в виде процентного отношения количества клеток H33-ми *TGF β2-1* и H33-ми *TGF β2-2* к количеству контрольных клеток *H33-pLSL-puro*, которые проползли через мембрану (8 мкм) по градиенту сыворотки в среде. Результаты получены в трех независимых экспериментах.

Активность *TGF β 1* в качестве индуктора клеточной подвижности была продемонстрирована ранее на культурах клеток карцином яичников и поджелудочной железы [16]. Более того, при воздействии *TGF β 1* в этих культурах наблюдалось подавление экспрессии бетагликана, а реэкспрессия этого гена приводила к снижению клеточной подвижности. Так как в исследуемой системе наблюдается снижение подвижности клеток и повышение экспрессии бетагликана, можно предположить, что бетагликан также вносит вклад в изменение клеточной подвижности в этой системе.

Заключение

Итак, мы показали, что при подавлении продукции *TGF β 2* в культуре дедифференцированной гепатомы H33 произошла реактивация транскрипции двух генов, экспрессия которых критична для поддержания дифференцировки гепатоцитов, и нарушение функции которых описано для ГК – *HNf4a* и *C/EBP α* . Более того, снижение синтеза *TGF β 2* привело к снижению таких ключевых для опухолевых клеток характеристик, как скорость пролиферации и подвижность.

Литература

1. Кудрявцева Е.И., Морозова О.В., Рудинская Т.Д., Энгельгардт Н.В. Нарушение межклеточных контактов и взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом в быстрорастущей гепатокарциноме мышей // Архив патологии. – 2001. – Т. 4. – С. 33–7.
2. Лазаревич Н.Л. Изменения спектров экспрессии генов при гепатоканцерогенезе и прогрессии опухолей печени. – Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук, М., МГУ – 2003.
3. Лазаревич Н.Л., Флейшман Д.И. Ткане-специфические транскрипционные факторы в прогрессии эпителиальных опухолей // Биохимия. – 2008. – Т. 73. – С. 713–734.
4. Флейшман Д.И., Морозова О.В., Лазаревич Н.Л. Сравнительная характеристика гепатокарцином мыши с различной степенью дифференцировки // Вестник Российского онкологического научного центра им. НН. Блохина РАМН. – 2008. – Т. 2. – С. 19–23.
5. Abou-Shady M., Baer H.U., Friess H. et al. Transforming growth factor betas and their signaling receptors in human hepatocellular carcinoma // Am. J. Surg. – 1999. – Vol. 177 – P. 209–15.
6. Aravalli R.N., Steer C.J., Cressman E.N. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma //Hepatology. – 2008. – Vol. 49 – P. 2047–63.
7. Bissell D.M., Wang S.S., Jarnagin W.R., Roll F.J. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver // J. Clin. Invest. – 1995. – Vol. 96 – P. 447–55.
8. Chiba H., Itoh T., Satohisa S. et al. Activation of p21CIP1/WAF1 gene expression and inhibition of cell proliferation by overexpression of hepatocyte nuclear factor-4alpha // Exp. Cell. Res. – 2005. – Vol. 302. – P. 11–21.
9. Derynck R., Zhang Y.E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling // Nature. – 2003. – Vol. 425. – P. 577–84.
10. Dong M., How T., Kirkbride K.C. et al. The type III TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression // J. Clin. Invest. – 2007. – P. 206–17.
11. Dong Z.Z., Yao D.F., Yao M. et al. Clinical impact of plasma TGF-beta1 and circulating TGF-beta1 mRNA in diagnosis of hepatocellular carcinoma // Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. – 2008. – Vol. 7 – P. 288–95.
12. Finger E.C., Turley R.S., Dong M. et al. TbetaRIII suppresses non-small cell lung cancer invasiveness and tumorigenicity // Carcinogenesis – 2008. – P. 528–35.
13. Flodby P., Liao D. Z., Blanck A. et al. Expression of the liver-enriched transcription factors C/EBP alpha, C/EBP beta, HNF1, and HNF4 in preneoplastic nodules and hepatocellular carcinoma in rat liver // Mol. Carcinog. – 1995 – Vol. 12 – P. 103–9.
14. Gordon K.J., Dong M., Chislock E.M. et al. Loss of type III transforming growth factor beta receptor expression increases motility and invasiveness associated with epithelial to mesenchymal transition during pancreatic cancer progression//Carcinogenesis. – 2007. – P. 252–62.
15. Greenbaum L.E., Cressman D.E., Haber B.A., Taub R. Coexistence of C/EBP alpha, beta, growth-induced proteins and DNA synthesis in hepatocytes during liver regeneration. Implications for maintenance of the differentiated state during liver growth // J. Clin. Invest. – 1995. – Vol. 96. – P. 1351–65.
16. Hempel N., How T., Dong M. et al. Loss of betaglycan expression in ovarian cancer: role in motility and invasion // Cancer Res. – 2007. – P. 5231–8.
17. Kalkuhl A., Kaestner K., Buchmann A., Schwarz M. Expression of hepatocyte-enriched nuclear transcription factors in mouse liver tumours // Carcinogenesis. – 1996. – Vol. 17 – P. 609–12.
18. Lazarevich N.L., Cheremnova O.A., Varga E.V. et al. Progression of HCC in mice is associated with a downregulation in the expression of hepatocyte nuclear factors // Hepatology. – 2004. – Vol. 39. – P. 1038–47.
19. Massague J. TGF-beta signal transduction // Annu. Rev. Biochem. – 1998. – P. 753–91.
20. Pardoll K., Moustakas A. Actions of TGF- β as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer // Biochimica et Biophysica Acta. – 2007 – Vol. 1775 – P. 21–62.
21. Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. Global cancer statistics, 2002 // Cancer J. Clin. – 2005. – Vol. 55 – P. 74–108.
22. Sato S., Futakuchi M., Ogawa K. et al. Transforming growth factor beta derived from bone matrix promotes cell proliferation of prostate cancer and osteoclast activation-associated osteolysis in the bone microenvironment // Cancer Sci. – 2008. – Vol. 99. – P. 316–23.
23. Schuster M.B., Porse B.T. C/EBPalpha: a tumour suppressor in multiple tissues? // Biochim. Biophys. Acta – 2006. – Vol. 1766. – P. 88–103.
24. Spöth G.F., Weiss M.C. Hepatocyte nuclear factor 4 provokes expression of epithelial marker genes, acting as a morphogen in dedifferentiated hepatoma cells // J. Cell Biol. – 1998 – Vol. 140 – P. 935–46.
25. Tsai J.F., Chuang L.Y., Jeng J.E. et al. Clinical relevance of transforming growth factor-beta 1 in the urine of patients with hepatocellular carcinoma // Medicine (Baltimore). – 1997. – Vol. 76 – P. 213–26.

Все это свидетельствует в пользу того, что при подавлении продукции *TGF β 2* в культуре H33 произошла частичная реверсия злокачественного фенотипа опухолевых клеток. Полученные результаты указывают на то, что разработка методов эффективного подавления продукции *TGF β 2* как *in vitro*, так и *in vivo* может оказаться перспективным направлением в развитии методов противоопухолевой терапии гепатоцеллюлярных карцином.

Благодарности

Авторы выражают благодарность проф. П.М. Чумакову за помощь в создании экспрессирующих векторов и Е.В. Сухаревой за техническое обеспечение работ.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (07-04-01422) и грантом для поддержки ведущих научных школ РФ.

УДК 616-006.81-033.2:616-092.9:615.371

*В.С. Мосиенко, В.А. Шляховенко, Ю.В. Яниш, В.В. Козак, Е.В. Карнаушенко, А.В. Вербиненко,
В.А. Милиневская, О.В. Мазур*

**ВЛИЯНИЕ ГЛИКОПЕПТИДНОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНЫ
НА РОСТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МЕТАСТАЗИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕЙ**

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

Контактная информация:

Мосиенко Владимир Сергеевич, д-р мед. наук, профессор.

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого

адрес: 03022, Украина, г. Киев, ул. Васильковская, 45; **тел.** +7 380(44)259-91-95; **факс** +7 380(44)258-16-56

e-mail: iepor@onconet.kiev.ua, www.onconet.kiev.ua

Статья поступила: 04.05.2009 г., принята к печати: 23.09.2009 г.

Резюме

Предложена оригинальная гликопептидная противоопухолевая вакцина, полученная из мембран злокачественных клеток, которая хорошо дозируется по количеству используемых для ее изготовления клеток. Вакцина достаточно долго может сохраняться в стерильных условиях при температуре $+4 \div +6^\circ\text{C}$ без потери биологической активности.

Целью работы было изучение противоопухолевой активности ГПВ на метастазирующих перевивных опухолях: меланоме В-16 и карциноме легкого Льюис на мышах линии С₅₇В1/6. Показано, что ГПВ, вводимая подкожно 4-кратно, с интервалом 1 раз в неделю в дозах, эквивалентных 100 000 и 1 000 000 клеток, увеличивает среднюю продолжительность жизни мышей с меланомой В-16 на 35,5–42 % по сравнению с мышами контрольной группы. ГПВ, вводимая подкожно, 4-кратно, с интервалом 1 раз в неделю в дозе, эквивалентной 500 000 клеток карциномы легкого Льюис, угнетала процесс метастазирования на 55 % и задерживала рост уже возникших метастазов на 80,4 %. Другие дозы ГПВ обладали меньшим противоопухолевым и антиметастатическим эффектом и слабо влияли на первично перевитую опухоль.

Имобилизованная на микрокапсулах двуокиси кремния в соотношении 1:1 гликопептидная вакцина не повышала противоопухолевых и антиметастатических свойств по сравнению с обычной вакциной.

Ключевые слова: гликопептидная противоопухолевая вакцина, перевивные метастазирующие опухоли, продолжительность жизни, мыши, меланома В-16, иммобилизованная вакцина

*V.S. Mosienko, V.A. Shlyakhovenko, Yu.V. Yanish, V.V. Kozak, E.V. Karnaushenko, A.V. Verbinenko,
V.A. Milinevskaya, O.V. Mazur*

**THE INFLUENCE OF GLYCOPEPTIDE CANCER VACCINE ON GROWTH
OF EXPERIMENTAL METASTATIC TUMORS**

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology
National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

Abstract

An original glycopeptide cancer vaccine from membranes of malignant cells has been developed. Vaccine is well-graduated and calibrated in terms of tumor cells from which it has been manufactured. A vaccine can be saved in sterile ampoules at a temperature of $+4 \div +6^\circ\text{C}$ long enough without the loss of biological activity. The purpose of investigation was to study the antitumor activity of GPV on metastatic transplantable tumors – melanoma B-16, and lung carcinoma Lewis in mice. Vaccine injected once a week in doses of 1×10^5 and 1×10^6 cell equivalents increases mean life span of animals with melanoma on 35,5–42 % as compared to control mice. GPV injected to mice once a week in dose equivalent 5×10^5 decreases metastases occurrence on 55 % and detains the growth of metastases on 80,4 %. Other doses of vaccine possessed a less antitumor and antimetastatic effect. A silica immobilized vaccine in a ratio of 1:1 did not promote antitumor and antimetastatic properties as compared to ordinary vaccine

Key words: cancer glycopeptide vaccine, metastatic transplantable tumors, melanoma B-16, silica immobilized vaccine.

Введение

Значительные достижения хирургии, трансплантологии, молекулярной биологии, генетики и других областей биологии и медицины к существенным успехам в лечении опухолевой болезни не привели [5; 7; 20]. Цитотоксическая противоопухолевая химиотерапия, лучевые и хирургические методы лечения до настоящего времени не дали желаемых результатов, за исключением некоторых системных заболеваний крови и рака кожи. Из более чем 120 противоопухолевых препаратов, которые сейчас используются в клинике, нет достаточно специфических вы-

сокоэффективных противоопухолевых средств. Практически все они высокотоксичны, кроме того, их невозможно доставить в достаточной концентрации в опухолевую ткань из-за дефектности капиллярного кровотока [7; 21]. Более 60 % злокачественных опухолей имеют первичную, а остальные – приобретенную устойчивость к цитостатикам, что не дает возможности провести успешное противоопухолевое лечение. Не дает оптимизма и таргетная терапия со своим подходом: «Новая мишень – новое средство – новое лечение». Противоопухолевая цитотоксическая терапия не учитывает законы саморегуляции организма, на которых основывается вся его жизнь.

Именно из этих позиций необходимо исходить при разработке новых методов и средств лечения. Известно [3; 9; 12; 16], что иммунная недостаточность способствует возникновению злокачественных опухолей и сопровождается в большинстве случаев опухолевую болезнь, особенно при лечении химио- и лучевой терапией. Именно такие изменения иммунного статуса онкологических больных стали основой интенсивного изучения иммуномодуляторов и вакцин, с целью активизировать иммунные механизмы противоопухолевой защиты и существенно улучшить эффективность комбинированного лечения [1; 8; 10; 17].

В последнее время наблюдается повышенный интерес к использованию вакцин, изготовленных из компонентов аутологических раковых или дендритных клеток [2; 4; 6]. На основе гликопептидов, полученных из мембран злокачественных клеток, были созданы вакцины, которые в эксперименте и клинике активизировали различные звенья иммунного ответа, и позитивно влияли на опухолевый рост [6; 13; 15]. Необходимо отметить, что до этого времени во всем мире не существует четких критериев конструирования эффективных противоопухолевых вакцин, отсутствуют принципы активной иммунизации вакцинами как способа лечения опухолевой болезни. Не разработаны показания к вакцинотерапии: дозы, режимы их введения при самостоятельном и комбинированном лечении, т.е. вакцинотерапия опухолей в большинстве случаев не вышла за рамки лабораторных исследований [6; 8; 19].

Целью работы было изучить противоопухолевую эффективность разработанной нами гликопептидной аутовакцины, вводимой в разных дозах животным с перевивными метастазирующими опухолями – меланомой В-16 и карциномой легкого Льюис.

Материалы и методы

Эксперименты проводились на 150 линейных мышах С₅₇В1/6 и F1 весом от 18 до 22 г обоих полов, разводимой вивария Института, выдержанных в условиях вивария в течение 14 суток в качестве карантина.

Гликопептидная противоопухолевая аутовакцина, разработана в Институте проф. В. Шляхоненко на основе комплекса гликопептидов, полученных из мембран злокачественных клеток [12].

Вакцину получали путем контролируемого ферментного гидролиза, после чего удалялись фрагменты нуклеиновых кислот, нуклеотиды, аминокислоты и другие низкомолекулярные соединения, проводили хроматографическое разделение, а затем концентрировали фракцию пептидов, содержащих углеводные остатки, с молекулярной массой 50 кДа. Известно, что белки, имеющие углеводные остатки, являются структурами с выраженными антигенными свойствами [11; 14].

Получение ГПВ проводится в стерильных условиях. Гликопептид хорошо стандартизуется по количеству клеток, из которых она готовится, и по содержанию белка. Полученная вакцина разливалась в ампулы и сохранялась при +4 ÷ 6 °С в условиях холодильника на протяжении 2 лет без потери активности.

ГПВ хорошо растворяется в воде и физиологическом растворе. Важной особенностью разработанной нами аутовакцины является возможность приготовления ее на несколько курсов введения. ГПВ вводилась подкожно в область верхней трети позвоночника мышам в различных дозах в объеме 0,1 мл через 1 сутки после перевивки опухоли, на 7; 14 и 21 сутки один раз в неделю в количестве 4 инъекций.

Карциному легкого Льюис и меланому В-16 перевивали внутримышечно в область правого бедра в количестве 500 000 клеток в объеме 0,2 мл изотонического раствора NaCl.

Противоопухолевый эффект изучали по динамике объема роста опухоли, количеству и объему метастазов легких, а также по средней продолжительности жизни мышей.

Основные результаты исследований обрабатывались статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В первой серии опытов изучалось влияние гликопептидной противоопухолевой аутовакцины в различных дозах, эквивалентных 100 000; 500 000 и 1 000 000 клеток меланомы на динамику роста перевивной опухоли и продолжительность жизни мышей линии С₅₇В1/6 с меланомой В-16.

В опыт взяты 50 мышей линии С₅₇В1/6, которым суспензией клеток в количестве 500 000 перевивали внутримышечно в правое бедро меланомы В-16. После перевивки опухоли животные разбивались на 4 группы, по 12 мышей в каждой.

Первая группа была контрольной.

Второй группе мышам вводилась аутологичная противоопухолевая вакцина через 1; 7 и 14 дней после перевивки меланомы В-16 в количестве трех инъекций подкожно, в дозе, эквивалентной 100 000 клеток меланомы В-16.

Третьей группе мышам вводилась аутологичная ГПВ в дозе, эквивалентной 500 000 клеток меланомы В-16, по схеме и в режиме второй группы.

Четвертой группе мышам вводилась аутологичная ГПВ в дозе, эквивалентной 1 000 000 клеток меланомы В-16, по схеме и в режиме второй группы мышам.

Первый замер опухолей в двух измерениях начинали на 10-й день после перевивки, когда опухоли появлялись у всех животных; в дальнейшем измерения производили через каждые 6 дней.

При изучении влияния ГПВ на динамику роста перевивной меланомы оказалось, что в начальном периоде наиболее выраженное торможение темпа роста опухолей (почти на 30 %) отмечалось у мышей 3-й группы, которым вводилась ГПВ в дозе, эквивалентной 500 000 раковых клеток. Однако на 20-й день, когда прекращали иммунизацию животных, темп роста опухоли мало чем отличался в различных группах исследуемых животных и по абсолютным величинам приближался к значениям контрольной группы. В группе мышам, которым вводилась доза, эквивалентная 100 000 клеток меланомы, размер опухоли даже несколько превышал размер опухоли мышам в контрольной группе, хотя эта разница не была статистически достоверной ($p > 0,05$).

Средняя продолжительность жизни с меланомой В-16 была максимальной в группе мышам, леченных ГПВ в дозах, эквивалентных 1 000 000 и 100 000 клеток меланомы, и достигала соответственно $32,0 \pm 6,1$ и $30,5 \pm 3,0$ сут по сравнению с таковой животных контрольной группы (в среднем $22,5 \pm 2,9$ сут). Динамика продолжительности жизни мышам с меланомой В-16, леченных ГПВ в различных дозах, показана на рис. 1. Максимальная продолжительность жизни отмечалась в группе мышам, иммунизированных дозой, эквивалентной 100 000 опухолевых клеток (72 сут). Несколько меньшей максимальной продолжительности жизни была в группе мышам, иммунизированных дозой 1 млн. клеточных эквивалентов.

Меньше прожили животные 3-й группы, получившие дозу, эквивалентную 500 000 меланомных клеток, где продолжительность жизни всего на 11,1 % увеличилась по сравнению с контрольной группой (рис. 1).

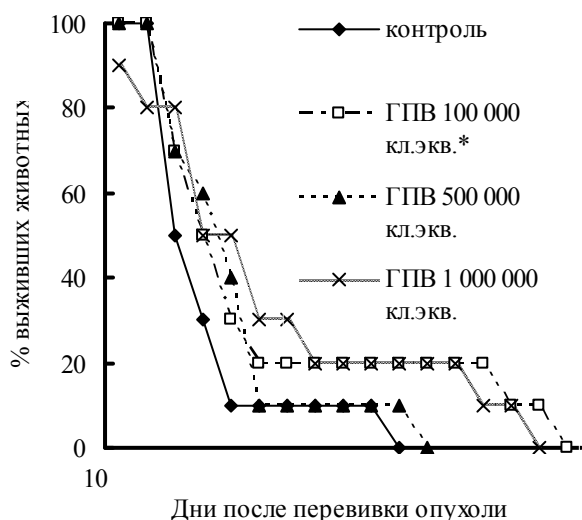


Рис. 1. Влияние различных доз ГПВ на продолжительность жизни мышей с меланомой B-16:

*клеточный эквивалент

Можно сделать вывод, что при использовании разных доз ГПВ наиболее эффективными оказались дозы, эквивалентные 1 000 000 и 100 000 меланомных клеток, т.е. в действии гликопептидной вакцины линейная зависимость эффекта от дозы не выявлена. При лечении ГПВ также отсутствует корреляция между СПЖ и размерами перевитой опухоли. ГПВ оказывает слабое влияние на первичную перевивную меланому B-16.

В следующей серии опытов изучалось влияние различных доз обычной и иммобилизованной на двуокиси кремния ГПВ на динамику роста перевивной карциномы легкого Льюис и ее метастазирование у мышей линии C57Bl/6. Иммобилизация ГПВ проводилась на микрочастицах двуокиси кремния, в весовом отношении 1:1, с целью пролонгирования действия аутовакцины и активации неспецифических механизмов противоопухолевой защиты [18].

В опыт взяты 50 мышей линии C₅₇Bl/6, которым суспензией клеток в количестве 500 000 была перевита внутримышечно в правое бедро задней конечности карцинома легкого Льюис. После перевивки животные разбивались на 5 групп по 10 мышей в каждой группе.

Первая группа была контрольной.

Вторая группа — мыши, которым вводилась обычная аутологическая вакцина на 1-е; 7-е; 14-е и 21-е сут после перевивки карциномы подкожно, в дозе, эквивалентной 100 000 клеток карциномы легкого Льюис.

Мыши **третьей группы** получали ГПВ аналогично второй группе, в дозе, эквивалентной 500 000 раковых клеток.

Мышам **четвертой группы** по той же схеме, что и во второй группе, вводилась иммобилизованная на микрочастицах двуокиси кремния ГПВ в дозе, эквивалентной 100 000 клеток карциномы легкого Льюис.

Мышам **пятой группы**, как и 4-й, вводилась иммобилизованная вакцина в дозе, эквивалентной 500 000 клеток карциномы легкого Льюис.

Животных забивали на 29-е сутки после перевивки и учитывали количество метастазов и их размер в легких у каждого животного.

Наименьшее количество метастазов и наименьший их объем в легких оказались в 3-й группе животных, которые получали обычную ГПВ в дозе, эквивалентной 500 000 раковых клеток, и составляли соответственно $12,0 \pm 6,5$ и $81,2 \text{ мм}^3$ и статистически значительно отличались от показателей контрольной группы ($p < 0,05$), где составляли соответственно $22,9 \pm 6,1$ и $414,3 \text{ мм}^3$ (рис. 2; 3).

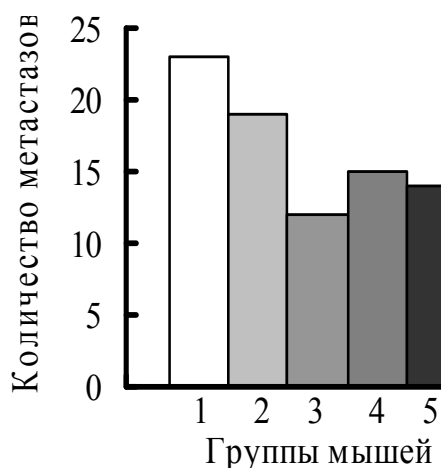


Рис. 2. Влияние ГПВ на количество метастазов карциномы легкого Льюис мышей:

- 1 — контроль;
- 2 — ГПВ 100 000 кл. экв.*;
- 3 — ГПВ 500 000 кл. экв.;
- 4 — ИГПВ 100 000 кл. экв.**;
- 5 — ИГПВ 500 000 кл. экв.

*клеточный эквивалент

**иммобилизованная на двуокиси кремния ГПВ

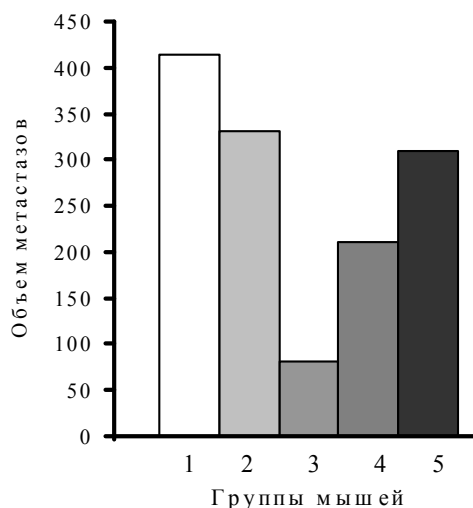


Рис. 3. Влияние ГПВ на объем метастазов карциномы легкого Льюис мышей:

- 1 — контроль;
- 2 — ГПВ 100 000 кл. экв.*;
- 3 — ГПВ 500 000 кл. экв.;
- 4 — ИГПВ 100 000 кл. экв.**;
- 5 — ИГПВ 500 000 кл. экв.

*клеточный эквивалент

**иммобилизованная на двуокиси кремния ГПВ

ГПВ, изготовленная из 500 000 раковых клеток, действовала не только на процесс метастазирования, что видно по уменьшению количества метастазов, но и на размер метастазов в легких (см. рис. 3). Объем их был в 5 раз меньше, чем объем метастазов в легких мышей контрольной группы. По-видимому, такая доза и режим введения ГПВ являются оптимальными в случае карциномы легкого Льюис.

Иммобилизованная на двуокиси кремния ГПВ была менее эффективна в 4-й группе, где количество метастазов составляло $14,7 \pm 4,1$, объем $210,0 \text{ мм}^3$, в 5 группе – $14,2 \pm 3,8$ и $309,6 \text{ мм}^3$ соответственно, имела место также тенденция к задержке роста карциномы легкого Льюис.

При изучении темпа роста перевитой внутримышечно карциномы противоопухолевый эффект выявлялся вначале только у мышей тех групп, в которых при иммунизации животные получали дозу, эквивалентную 100 000 раковых клеток, и сохранялся до конца опыта, когда размеры опухолевых узлов у мышей леченных групп были на 6–12 % меньше размера первичной опухоли у мышей контрольной группы (рис. 4).

Следует отметить, что наибольшая разница в размерах опухолевых узлов у вакцинированных мышей по сравнению с животными группы контроля отмечалась между 15 и 25 сутками опыта.

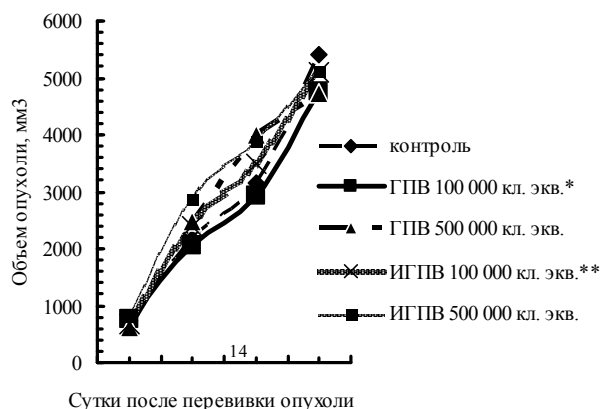


Рис. 4. Влияние ГПВ на рост перевивной карциномы легкого Льюис:

*клеточный эквивалент

**иммобилизованная на двуокиси кремния ГПВ

Разработанная нами гликопептидная аутовакцина была использована в терапевтических опытах по изучению ее противоопухолевого и антиметастатического действия и влияния на среднюю продолжительность жизни мышей с перевивной меланомой В-16.

При исследовании влияния ГПВ на динамику роста перевивной меланомы В-16 и продолжительность жизни мышей оказалось, что аутовакцина в начале лечения задерживает темп роста перевивной опухоли, причем больше всего замедлялся рост у животных в группе получавших дозу, эквивалентную 1 000 000 опухолевых клеток. К 20-м суткам опыта темп роста опухолей выравнивался во всех группах и отличался от роста опухолей у животных контрольной группы в пределах 5–7 % по объему опухолевого узла.

СПЖ мышей оказалась наибольшей в группах животных, леченых ГПВ в дозах, эквивалентных 100 000 и 1 000 000; чья средняя продолжительность жизни на 42,0 и 35,5 % соответственно превышала продолжительность жизни животных контрольной группы.

При изучении влияния различных доз обычной ГПВ и вакцины, иммобилизованной на микрочастицах двуокиси кремния в соотношении 1 : 1, на рост первичной перевивной карциномы легкого Льюис и ее метастазирование в легкие обнаружено, что темп роста перевивной опухоли в группах мышей, которые получали обычную и иммобилизованную на микрочастицах двуокиси кремния вакцину, почти не отличались между собой.

Учитывая данные ряда авторов о повышении эффективности противоопухолевых вакцин, иммобилизованных на частицах двуокиси кремния [18], можно полагать, что усиление противоопухолевого эффекта будет выявлено при других соотношениях композита вакцина/двуокись кремния.

Изучение влияния различных доз ГПВ на метастазирование показало, что наиболее эффективной оказалась обычная аутовакцина в дозе, эквивалентной 500 000 опухолевых клеток. Количество метастазов и их объем в легких мышей 3-й группы составили $12,0 \pm 6,5$ и $81,2 \text{ мм}^3$ по сравнению с таковыми животных контрольной группы, у которых данные показатели равнялись $22,9 \pm 6,1$ и $413,3 \text{ мм}^3$ соответственно.

Изучение изменения массы тела животных и селезенки при лечении различными дозами ГПВ при различных режимах введения вакцины показало, что в конце опыта они мало отличались у мышей исследуемых групп и почти не отличалась от массы тела мышей контрольной группы.

Выводы

1. Разработан новый вариант гликопептидной противоопухолевой вакцины, полученной из мембран опухолевых клеток. Аутовакцина хорошо дозируется по количеству клеток, из которых она изготовлена, может долго сохраняться в стерильных условиях, не теряя своей биологической активности.
2. ГПВ в дозах, эквивалентных 100 000 – 1 000 000 опухолевых клеток, увеличивает продолжительность жизни мышей с меланомой В-16 на 35,5–42,0 % по сравнению со средней продолжительностью жизни мышей контрольной группы и оказывает слабое влияние на рост первичного узла перевитой внутримышечно опухоли.
3. ГПВ, вводимая подкожно в дозе, эквивалентной 500 000 раковых клеток карциномы легкого Льюис, угнетает процесс метастазирования на 55 % и задерживает рост уже возникших метастазов на 80,4 %. Другие дозы, а также иммобилизованная на двуокиси кремния в соотношении 1 : 1 вакцина обладает меньшим антиметастатическим эффектом.
4. Гликопептидная противоопухолевая вакцина обладает выраженными антиметастатическими свойствами по отношению к перевивной карциноме легкого Льюис и незначительно влияет на первичную перевитую опухоль.
5. ГПВ, иммобилизованная на микрочастицах двуокиси кремния в соотношении 1 : 1, в использованном режиме применения не выявила заметного противоопухолевого и антиметастатического действия.

Литература

1. Балуева И.А. Противоопухолевые вакцины // Практич.онкология. – 2003. – Т. 3, № 4. – С. 157–66.
2. Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Михайлова И.Н., Петенко Н.Н. Вакцинация рака: от эксперимента к клинике // Вестник РАМН. – 2007. – № 10. – С. 46–8.
3. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Иммунология злокачественного роста. – Киев, «Наукова Думка», 2005. – 786 с.
4. Гриневич Ю.А., Хроновская Н.Н. Современные концепции иммунотерапии в онкологии. Обзор литературы и собственные исследования // Жур. Акад. Мед. наук Украины. – 2007. – Т. 13, № 4. – С. 655–75.
5. Иванов В.Г., Семглазов В.В., Семглазов В.Ф. и др. Таргетная (целевая) терапия рака молочной железы. Миф и реальность // Рус. мед. журнал. – 2007. – Т. 15, № 6. – С. 1118–22.
6. Моисеенко В.М. Возможности вакцинотерапии меланомы кожи // Рос.онкол журн. – 2005. – № 2. – С. 52–6.
7. Мосиенко В.С. Возможности, недостатки и перспективы лекарственной терапии опухолевой болезни // Укр. химиотерапевтический журнал. – 2001. – № 1. – С. 10–4.
8. Мосиенко В.С., Шляховенко В.А. Использование вакцин для лечения опухолевой болезни // Клин. Иммунология. Аллергология. Инфектология. – 2006. – Т. 1, № 2. – С. 80–4.
9. Петров Р.В. Иммунология. – М.: Медицина, 1987. – 415 с.
10. Потебня Г.П. и др. Противоопухолевые вакцины: перспективы применения в клинической онкологии // Онкол. – 2004. – Т. 6, № 3. – С. 167–74.
11. Шляховенко В.О., Мосієнко В.С., Козак В.В. и др. Протипухлинна аутовакцина на основі глікопептидів пухлинних клітин // Онкологія. – 2004. – Т. 6, № 3. – С. 180–4.
12. Шляховенко В.О., Потебня Г.П., Мосієнко В.С., Козак В.В. и др. Спосіб одержання протипухлинної аутовакцини. Патент України на винахід. №57.608 від 16.06.2003р.
13. Биологические методы лечения онкологических заболеваний. Под ред. Де Вита и соавт. М.: Медицина. – 2002. – 918 с.
14. Butteau C. Challenges in the development of effective peptide vaccines for cancer // Mayo Clin. Proc. – 2002. – № 77. – P. 339–49.
15. Chen C.H., Wu T.C. Experimental vaccine strategies for cancer immunotherapy // J. Biomed. Sci. – 1998. – № 5. – P. 231–3.
16. Dolgish A.G. Immunotherapy and development of cancer vaccines // Exp.ref.vaccines. – 2006. – Vol. 5, № 1. – P. 1–4.
17. Hockertz S. Present and future of cancer vaccines // Toxicology. – 2005. – № 214. – P. 151–61.
18. Mitchell M.S., Kan- Mitchell J., Morrow P.R. et al. Phase I. Trial of large multivalent immunogen derived from melanoma lysates in patients with dissiminated melanoma // Clin. Cancer Research. – 2004. – № 10. – P. 76–83.
19. Parmiani G. et al. Cancer immunotherapy with peptide – based vaccines: what have we achieved? Where are we going? // J.Nat. Cancer Inst. – 2002. – № 94. – P. 805–18.
20. The end of the beginning Nature ref // Drug Discov. – 2006, Vol. 5, № 9. – P. 705.
21. Шмид Ф. Современные представления о гомотоксических фазах Рекевега // Биологическая терапия – 1997. – № 1. – С. 17–21.

**МАТЕРИАЛЫ VIII ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
«ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ». ТЕЗИСЫ:**

С.М. Адекенов, А.Ю. Барышников, М.В. Огородникова, Д.В. Соколова, С.Б. Ахметова, А.Ж. Турмухамбетов, Р.И. Джалмаханбетова

ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ НА АПОПТОЗ КЛЕТОК.....8

Т.Г. Боровская, В.Е. Гольдберг, О.А. Румпель, А.В. Перова, А.В. Пахомова, Е.Д. Гольдберг

ВЛИЯНИЕ ПАКЛИТАКСЕЛА НА РЕПРОДУКТИВНУЮ СИСТЕМУ КРЫС-САМЦОВ.....8

Г.К. Герасимова, Т.А. Сидорова, Е.В. Хорошева, А.А. Штиль

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ТЕРАФТАЛ + АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА
В ОТНОШЕНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

С ФЕНОТИПОМ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ.....20

Е.А. Кудинова, Т.М. Кулинич, Е.Ф. Филясова, А.В. Иванов, В.К. Боженко

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ИНТЕРНАЛИЗУЕМОГО ПЕПТИДА,
ВКЛЮЧАЮЩЕГО ИНГИБИТОР ЦИКЛИНОВЫХ КИНАЗ,**

НА КРАТКОСРОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА.....20

Н.В. Плявник, Г.А. Серебренникова

ДИЗАЙН КАТИОННЫХ ЛИПИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫЕ

ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ НАНОЧАСТИЦ.....26

А.Ф. Лазарев, В.Д. Петрова, Н.А. Михеева, Е.Л. Секержинская, Т.В. Синкина

ОЦЕНКА ПЕРЕНОСИМОСТИ АНАСТЕРЫ У ПАЦИЕНТОК С ПРОГРЕССИРУЮЩИМ РМЖ.....56

Е.В. Лукашева¹, О.С. Жукова², А.Ю. Аринбасарова³, А.Г. Меденцев³, К.В. Макрушин³, Е.М. Трещалина²,

А.Ю. Барышников², Т.Т. Березов¹

ПОЛУЧЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ L-ЛИЗИН- -ОКСИДАЗЫ С АНТИТЕЛАМИ

И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ.....80

Г.К. Герасимова, Т.А. Сидорова, Е.В. Хорошева, А.А. Штиль

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ТЕРАФТАЛ + АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА
В ОТНОШЕНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК С ФЕНОТИПОМ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ**
РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Введение. Бинарная каталитическая система ТФ+АК проходит клинические испытания как новое лекарственное средство для лечения злокачественных опухолей. Препарат ТФ (окта-4,5-карбоксифталцианин кобальта) – катализатор окисления АК, синтезирован в ФГУП «ГНЦ «НИОПИК». На предклиническом этапе исследований была выявлена цитотоксическая активность ТФ+АК в отношении 5 культур опухолевых клеток человека.

Цель исследования. Изучение влияния ТФ+АК на опухолевые клетки с фенотипом множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), обусловленной белками-транспортерами Pgp и MRP.

Материалы и методы. Культуры опухолевых клеток: родительские линии, чувствительные к препаратам круга МЛУ: гепатома крыс McA RH 7777, эритролейкоз человека K562, аденокарцинома молочной железы человека линии MCF-7, немелкоклеточного рака легкого человека COR/L23P и их варианты с разными механизмами и уровнем МЛУ. Исследованы: цитотоксическая активность ТФ и ТФ+АК относительно обоих вариантов клеток, способность этих препаратов модулировать цитотоксичность винкристина, чувствительность клеток к доксорубину (Докс) после лечения их ТФ+АК в течение 8 пассажей. Жизнеспособность опухолевых клеток оценивали МТТ тестом. EC50 определяли методом регрессионного анализа с использованием программы GraphPad PRIZM.

Результаты. Выявлено, что все исследованные клетки с фенотипом МЛУ, обусловленной белками-транспортерами Pgp или MRP в 2–4 раза более чувствительны к ТФ+АК, чем клетки родительской линии. При этом не выявлено модифицирующего действия ТФ и ТФ+АК на цитотоксическую активность винкристина, в то время как известный модулятор Pgp-опосредованной МЛУ — верапамил обладал выраженной хемосенсибилизирующей активностью. При многократном лечении клеток K562/4 с индуцированной устойчивостью к Докс каталитической парой ТФ+АК обнаружено значительное снижение их устойчивости к Докс: EC50 для чувствительного и устойчивого вариантов линии K562 к 8 пассажу стали равны. Восстановление чувствительности к Докс клеток K562/4 может быть следствием более быстрой гибели в популяции устойчивых клеток по сравнению с чувствительными. Механизм различий в цитотоксичности ТФ+АК в отношении клеток с фенотипом МЛУ и родительских линий не ясен.

Выводы. 1) Клетки с фенотипом МЛУ в 2–4 раза более чувствительны к каталитической системе ТФ+АК, чем клетки родительских линий. 2) ТФ и ТФ+АК не являются ингибиторами белка Pgp, т.к. не влияют на его функцию. 3) Длительное лечение ТФ+АК клеток с фенотипом Pgp-МЛУ приводит к восстановлению их чувствительности к Докс. 4) Результаты исследования дают основание предположить, что в процессе лечения повторными курсами ТФ в присутствии АК возможно восстановление чувствительности опухолей не только к доксорубину, но и другим препаратам круга МЛУ.

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

Е.А. Кудинова, Т.М. Кулинич, Е.Ф. Филясова, А.В. Иванов, В.К. Боженко

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ИНТЕРНАЛИЗУЕМОГО ПЕПТИДА,
ВКЛЮЧАЮЩЕГО ИНГИБИТОР ЦИКЛИНОВЫХ КИНАЗ,
НА КРАТКОСРОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**
ФГУ РНЦ Рентгенрадиологии Росмедтехнологий, Москва

Ингибиторы циклиновых киназ наиболее часто повреждаются в процессе канцерогенеза. Результатом этого является повышение активности циклинов и, как следствие, нарушение контроля пролиферации. Поэтому поиск эффективных, избирательных, низкотоксичных ингибиторов циклиновых киназ является одним из актуальных направлений современной экспериментальной онкологии. Альтернативным направлением является использование естественных ингибиторов циклиновых киназ (варианты генной терапии) или их фрагментов – функциональных пептидов. Ранее мы показали, что химерные интернализуемые пептиды, включающие фрагменты ингибиторов циклиновых киназ D или A типа эффективны в качестве цитостатических и цитотоксических агентов в отношении перевиваемых клеточных линий как *in vitro*, так и *in vivo*.

Задача исследования. Изучить цитотоксическую активность интернализуемых пептидов, содержащих ингибиторы циклиновых киназ в краткосрочных культурах опухолей человека.

Материалы и методы. Исследуемый химерный пептид представляет собой последовательность, включающую интернализуемую часть – Antp (участок белка Antennapedia плодовой мухи Дрозофилы) и функционально-активную часть – p16, последовательность, идентичную фрагменту p16INK4a. Краткосрочные культуры получали из операционного материала путем механического разделения клеток. Клетки высаживались в среду ДМЕМ, содержащую 10 % ФСБ, глутамин и антибиотик. Через 24 ч инкубации среду меняли на новую, содержащую в опытных образцах 40 мкМ исследуемого пептида Antp_p16. Нами были исследованы следующие культуры: рак почки, неизмененная, рак тела матки, рак эндометрия, рак шейки матки, рак желудка, рак яичника, рак молочной железы. В качестве контроля были исследованы также цитотоксические свойства на нормальные ткани соответствующих органов. Методом проточной цитометрии оценивали уровень апоптоза и некроза с помощью двойной окраски Annexin V – пропидий йодид. Также часть каждого образца была зафиксирована и в дальнейшем окрашена пропидий йодидом, для определения уровня субдиплоидного пика. Для дифференциации опухолевых клеток использовали антитела к цитокератину.

Результаты. Нами было показано, что пептид Antp_p16 в концентрации 40 мкМ приводит к увеличению уровня апоптоза для ряда опухолей. Для краткосрочной культуры рака почки наблюдали увеличение уровня апоптоза до 31,8 % при внесении в культуральную среду Antp_p16 40 мкМ, уровень апоптоза в контрольном образце составлял 8,6. В краткосрочной культуре рака желудка апоптоз возрастал до 58,1 % при инкубации с исследуемым пептидом. В краткосрочной культуре неизмененной слизистой желудка уровень апоптоза увеличился до 22,2 %. В краткосрочных культурах рака яичника, неизмененная ткань маточной трубы, рак тела матки (рак эндометрия) и неизмененная ткань тела матки (эндометрий) внесение химерного пептида Antp_p16 в концентрации 40 мкМ не приводило к достоверному изменению уровня апоптоза. При добавлении исследуемого пептида к культуре рака молочной железы наблюдалось увеличение уровня апоптоза с 17,3 % до 42%. А в культуре нормальной ткани молочной железы уровень апоптоза возрастал с 11,1 % до 50,6 %.

Выводы. На модели краткосрочных культур опухолей человека показано, что интернализуемый пептид, включающий ингибитор циклиновых киназ D типа – p16INK4a проявляет избирательные цитотоксические свойства по отношению к опухолевым клеткам для таких локализаций как рак почки и рак желудка по сравнению с аутологической нормальной тканью. При этом исследуемый пептид был не эффективен для рака эндометрия, рака матки и рака яичника.

УДК 616.24+616.348]-006.6:611.13/16

Н.В. Хромова¹, П.Б. Копнин², Е.В. Степанова¹, Б.П. Копнин¹**ВЛИЯНИЕ ПОДАВЛЕНИЯ СИНТЕЗА VEGF-C В КЛЕТКАХ РАКА ЛЕГКОГО И ОБОДОЧНОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА НА ИХ РОСТ, МИГРАЦИОННУЮ И АНГИОГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ**¹РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва²ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва**Контактная информация:**

Хромова Наталья Викторовна, научный сотрудник лаборатории цитогенетики НИИ канцерогенеза.

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(495)324-57-22; **моб.** +7(916)700-88-60**e-mail:** nakhromova@yandex.ru

Статья поступила: 04.05.2009 г., принята к печати: 23.09.2009 г.

Резюме

VEGF-C играет важную роль в процессах канцерогенеза, регулируя опухолевый лимфангиогенез и, в меньшей степени, гемангиогенез. Кроме того, он обладает способностью стимулировать пролиферацию и миграцию опухолевых клеток. В настоящей работе исследована возможность ингибирования опухолевого роста путем подавления экспрессии VEGF-C. С этой целью создана лентивирусная конструкция, экспрессирующая siVEGF-C. Обнаружено, что трансдукция этой конструкции в клетки рака толстой кишки (линия HCT116) и рака легкого (линия A549) человека, значительно понижающая содержание в них мРНК VEGF-C, уменьшает скорость прироста числа клеток и миграционную активность клеток *in vitro*, ингибирует образование кровеносных и лимфатических сосудов в их ксенографтах у бестимусных мышей и, как следствие, замедляет скорость опухолевого роста. Полученные данные указывают на то, что VEGF-C может представлять собой новую перспективную мишень для таргетной противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: рак, VEGF-C, VEGFR-3, ангиогенез, лимфангиогенез.N.V. Khromova¹, P.B. Kopnin², E.V. Stepanova¹, B.P. Kopnin¹**EFFECT OF SUPPRESSION VEGF-C SYNTHESIS IN HUMAN LUNG AND COLON CARCINOMA CELLS ON THEIR GROWTH, MIGRATORY AND ANGIOGENIC ACTIVITY**¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow**Abstract**

VEGF-C plays an important role in oncogenesis, regulating tumor lymphangiogenesis and, to a lesser degree, hemangiogenesis. In addition, it is able to stimulate proliferation and migration of tumor cells. In the present study possibility of inhibition of tumor growth by suppression of VEGF-C expression was investigated. For this purpose we created lentiviral vector expressing siVEGF-C. It was found that transduction of this construct into human colon (HCT116) and lung (A549) carcinoma cells, considerably reduced content of mRNA VEGF-C, decreased cell proliferation and migration *in vitro*, inhibited formation of blood and lymphatic microvessels in tumor xenografts, and, as a result, diminished tumor growth rate. These data suggest that VEGF-C may be novel perspective target for anticancer therapy.

Key words: cancer, VEGF-C, VEGFR-3, angiogenesis, lymphangiogenesis.**Введение**

VEGF-C, представитель семейства гепарин-связывающих факторов роста, может играть важную роль в процессах канцерогенеза [11; 16; 17]. Его взаимодействие с рецепторами VEGFR3 и VEGFR2 (VEGFR3 связывает VEGF-C со значительно большей аффинностью, чем VEGFR2) активирует ряд внутриклеточных сигнальных путей (Ras-MAPK и др.), регулирующих размножение и миграцию клеток [5; 8; 16; 19; 20]. Основная мишень VEGF-C – VEGFR3 присутствует на поверхности эндотелиальных клеток лимфатических сосудов, некоторых других типах нормальных клеток (остеокласты, тимоциты, субпопуляция моноцитов периферической крови) и многих типах опухолевых клеток [16]. VEGFR2, главным образом, экспрессируются в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов и, в меньших количествах, в их предшественниках [1; 13]. Интересно, что в опухолевых сосудах экспрессия

VEGFR2 в 3–5 раз выше, чем в сосудах нормальных тканей. Другие клетки опухолевых тканей (неопластические и стромальные), как правило, содержат значительно меньшие количества VEGFR2 [16; 17]. При этом аффинность VEGFR2 к VEGF-C существенно ниже, чем к VEGF-A, играющему ключевую роль в регуляции роста кровеносных сосудов в нормальных и опухолевых тканях. Это дало основание рассматривать VEGF-C как фактор, регулирующий, в первую очередь, лимфангиогенез. Подобно гемангиогенезу, опухоли могут индуцировать формирование собственной сети лимфатических сосудов, соединяющейся с окружающими лимфатическими сосудами. Перемещение опухолевых клеток по лимфатическим сосудам представляет собой один из способов метастазирования. Считается, что увеличение продукции лимфангиогенных факторов может стимулировать формирование дополнительных лимфатических сосудов, таким образом, обеспечивая распространение опухолевых клеток.

VEGF-C индуцирует не только внутриопухолевый лимфангиогенез, но и количество лимфатических сосудов вокруг опухоли. Считается, что именно эти периферические лимфатические сосуды принимают участие в лимфогенном метастазировании [18; 21].

До недавнего времени исследования цитокинов семейства VEGF были сосредоточены на их функциях как паракринных стимуляторов ангиогенеза и лимфангиогенеза. VEGF-A и его рецепторы VEGFR-1/2 коэкспрессируются в ряде опухолей, включая рак молочной железы, рак простаты, толстой кишки, поджелудочной железы, указывая на то, что VEGF-A может непосредственно влиять на рост опухолевых клеток через аутокринный механизм [2; 4; 14].

Недавно было обнаружено, что VEGF-C, подобно VEGF-A, может принимать участие не только в паракринной, но и в аутокринной регуляции размножения и миграции неопластических клеток при раке желудка [9].

На многих экспериментальных моделях было показано, что гемангиогенез в основном стимулируется за счет взаимодействия VEGF-A и VEGF-B с VEGFR-1/2, тогда как VEGF-C/VEGFR-3 – сигнализация является ключевым регулятором опухолевого лимфангиогенеза.

Таким образом, разрушение взаимодействия ростовой фактор/рецептор является современной стратегией для развития изучения противоопухолевых препаратов.

В последние годы убедительно продемонстрировано, что подавление функции VEGF-A с помощью терапевтического антитела (бевацизумаб) препятствует образованию в опухолях кровеносных сосудов и, как следствие, замедляет прогрессию новообразований [6; 12].

Создание конструкции, экспрессирующей siVEGF-C

При создании конструкции, экспрессирующей siVEGF-C, мы использовали лентивирусный вектор pLKO.1-puro (Sigma). Для получения вектора, стабильно экспрессирующего siVEGF-C, были синтезированы олигонуклеотиды (Evrogen):

во-первых, для shVEGF-C №1 –

CCGGCGCGACAAACACCTTCTTTAACTCGAGTTAAAGAAGGTGTTTGTGCGGTTTTTG;

для shVEGF-C №2 – CCGGCCCCACAAAGAAGTACAGAACTCGAGTTCTGTCTAGTTCTTTGTGGTTTTTTG и,

во-вторых, комплементарная им последовательность ДНК. Образованный в результате гибридизации указанных олигонуклеотидов фрагмент двуцепочечной ДНК, в состав которого была включена дважды повторяющаяся последовательность shVEGF-C (выделена жирным курсивом), гомологичная участку человеческой мРНК гена VEGF-C, была клонирована в вектор pLKO.1-puro по сайтам рестрикции эндонуклеаз AgeI и EcoRI.

Получение клеточных линий, экспрессирующих siVEGF-C

Для липофекции эукариотических клеток был использован реагент ExGen 500 (Fermentas). ДНК (pLKO.1-shVEGF-C), хелперные плазмиды dR 8,2 и pVSV-G, 150мМ NaCl и ExGen 500 смешивали согласно протоколу фирмы производителя и по каплям добавляли к клеткам-упаковщикам 293T, выращенным до состояния 70% монослоя. Через 12 часов культуральная среда заменялась свежей.

Последующее заражение линии A549 и сублиний HCT116 рекомбинантными вирионами, полученными через 24; 48; 72 ч после липофекции, проводили, используя супернатант культур пакующих клеток. Селекция проводилась с использованием пуromидина в течение 5 дней.

Определение уровня экспрессии VEGF-C методом ОТ-ПЦР

Тотальную мРНК выделяли с помощью TRI Reagent (Sigma). Реакцию обратной транскрипции проводили, как описано ранее [10]. Для определения уровня экспрессии VEGF-C использовали праймеры: прямой 5'– CAGTTACGGTCTGTGTCCAGTGTAG -3', обратный 5'– GGACACACATGGAGGTTTAAAGAAG -3'; уровень экспрессии VEGFR-3 определяли, используя праймеры: прямой 5'– CTTGTGCGGTACCGGCGTCATC -3' и обратный 5'– GAGGATCTTGAGCTCCGACATCAG -3'; для выравнивания к-ДНК использовали праймеры к α -тубулину: прямой 5'– GTTGGTCTGGAATTCTGTCTAG -3', обратный 5'– AAGAAGTCCAAGCTGGAGTTC -3'.

Определение скорости роста клеточных культур

Клетки A549 и сублиний HCT116 рассевали в 6-луночные плашки по 50 000 и 25 000 соответственно. Для определения скорости роста проводился подсчет количества клеток в культуре в камере Горяева с интервалом в 2 сут. Счет продолжался до момента образования монослоя.

Это дало основание рассматривать такой подход как один из наиболее перспективных в т.н. таргетной (направленной) противоопухолевой терапии. В то же время возможный терапевтический потенциал ингибирования VEGF-C пока практически не изучен.

В настоящей работе исследованы возможные последствия для опухолевого роста подавления продукции VEGF-C. Для ингибирования синтеза VEGF-C нами был создан лентивирусный вектор, экспрессирующий специфичную шпилечную РНК. В качестве экспериментальной модели использованы человеческие клетки рака легкого A549 и рака ободочной кишки линии HCT116. Полученные данные показывают, что подавление продукции VEGF-C может замедлять рост и прогрессию опухолей как за счет блокирования аутокринной регуляции размножения и миграции неопластических клеток, так и в результате прерывания паракринной стимуляции гемангиогенеза и лимфангиогенеза. Очевидно, VEGF-C представляет собой еще одну перспективную молекулярную мишень, подавление функции которой может найти применение в лечении онкологических больных.

Материалы и методы

Клеточные линии

Использованы линия клеток аденокарциномы легкого человека A549 (ATCC #CCL-185), линия клеток рака ободочной кишки человека HCT116, (p53+/+, ATCC #CCL-247) и ее сублиния HCT116/p53–/– с гомозиготным нокаутом гена p53.

Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки и пенициллина/стрептомицина при 37 °C и 5%-ным содержанием CO₂.

Определение миграционной активности клеток

Проводилось как описано ранее [15]. В лунки 24-луночной плашки вставляли камеру Бойдена с диаметром пор 8 мкм, внутрь которой сеяли 50 тысяч клеток. Инкубировали 24 часа при 37 °C и 5%-ном содержании CO₂ в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки, оставшиеся сверху в камере, убирали ватной палочкой, мигрировавшие клетки фиксировали метанолом и окрашивали трипановым синим. Миграционная активность определялась подсчетом числа клеток на нижней поверхности мембраны в 10 полях зрения, используя объектив 20×.

Анализ роста опухолевых ксенографтов

В работе использовались самки бестимусных мышей линии D2×J в возрасте 6–8 недель. Каждому животному подкожно прививалось по 2 опухоли (10⁶ клеток, суспендированных в 100 мкл физиологического раствора). Размер опухолей измерялся каждые 3 дня, их объем высчитывался по формуле:

$$(\text{ширина})^2 \times (\text{длина}) \times 0,5$$

Продолжительность эксперимента составляла 3 нед. для роста ксенографтов HCT116 и 5–6 нед. для роста ксенографтов A549.

Иммуногистохимический анализ препаратов тканей опухолей

Проводили, как описано ранее [7]. Ткани опухолей фиксировались в 4%-ном формалине в течение 24 ч и заключались в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивались антителами к CD34 (550537, BD Pharmingen) и LYVE-1(103-PA50S, ReliaTech GmbH). Связывание первичных антител детектировалось с помощью проявочной системы EnVision-HRP (Dako). После этого препараты окрашивали гематоксилином.

Подсчет CD34-позитивных кровеносных сосудов и капилляров проводился под микроскопом при увеличении ×100.

Гемангиогенез в опухолях оценивался по среднему суммарному количеству сосудов с просветами, относительно крупных (≥100 мкм) сосудов, и недоразвитых сосудов как описано нами ранее [7]. Подсчет внутриопухолевых LYVE-1-позитивных лимфатических сосудов проводился при увеличении ×200. В каждой экспериментальной группе исследовали срезы 8–12 опухолей, для каждой опухоли анализировали 20 полей зрения.

Результаты и обсуждение

Схема получения лентивирусных конструкций, экспрессирующих siVEGF-C представлена подробно описана в разделе «Материалы и методы».

Для проверки работы конструкций pLKO.1-shVEGF-C мы провели инфекцию линий A549, HCT116 и ее сублинии HCT116 p53^{-/-} с гомозиготным нокаутом p53. В качестве контроля опухолевые клетки инфицировались вектором, экспрессирующим siGFP.

Полуколичественный метод ОТ-ПЦР показал, что введение обеих конструкций pLKO.1-shVEGF-C приводит к существенному снижению уровня мРНК VEGF-C в клетках линий A549 и сублинии HCT116.

Интересно, что подавление экспрессии VEGF-C приводило к существенному снижению уровня мРНК гена VEGFR3, кодирующего (рис. 1) рецептор VEGF-C (механизмы такой регуляции пока неясны).

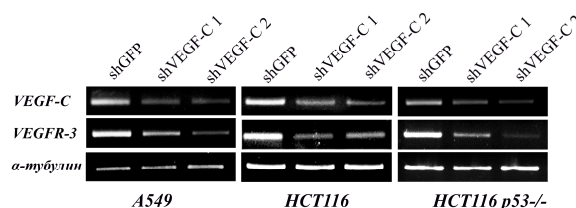


Рис. 1. Трансдукция лентивирусной конструкции pLKO.1-shVEGF-C приводит к снижению содержания мРНК VEGF-C и VEGFR-3 в клетках A549, HCT116 и HCT116/p53^{-/-} (анализ содержания мРНК α-тубулина использован для контроля количества нанесенных образцов). Представлены типичные данные одного из трех экспериментов.

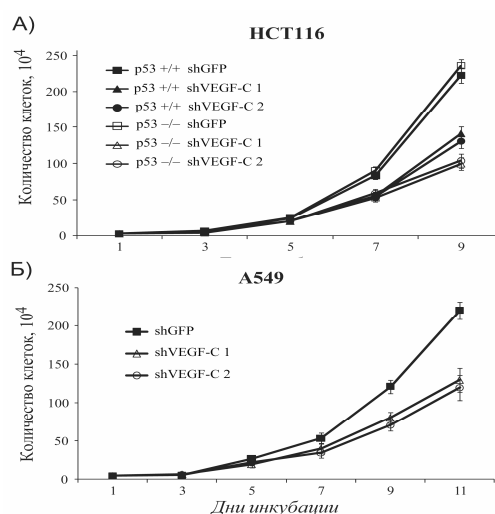


Рис. 2. Влияние подавления экспрессии VEGF-C на скорость размножения культивируемых *in vitro* клеток HCT116 (А) и A549 (Б): Клетки рассеивали в 6-луночные плашки и подсчитывали их количество каждые 2 дня, как описано в разделе Материалы и методы. Каждая точка – средние величины для 3 лунок; представлены типичные данные одного из трех экспериментов.

Эти результаты дали основание для дальнейших исследований последствий ингибирования сигнализации VEGF-C/VEGFR-3 для роста и миграции опухолевых клеток.

Во-первых, мы исследовали изменения поведения клеток с подавленной экспрессией VEGF-C в культурах *in vitro*. Оказалось, что снижение экспрессии VEGF-C тормозит скорость размножения как p53-позитивных (A549, HCT116), так и p53-дефицитных (рис. 2) клеток (HCT116 p53^{-/-}).

Кроме того, ингибирование экспрессии VEGF-C приводит к двукратному снижению миграционной активности p53-позитивных клеток линий A549 и HCT116, тогда как клетки HCT116/p53^{-/-}, экспрессирующие siVEGF-C, не демонстрировали достоверного подавления миграционной способности (рис. 3).

Возможно, это связано с тем, что p53-негативные клетки характеризуются исходно низкой миграционной активностью, и подавление VEGF-C уже не может оказать существенного дополнительного влияния на их миграцию.

В целом результаты экспериментов *in vitro* указывают на существенную роль VEGF-C в аутокринной регуляции размножения и миграционной активности клеток рака легкого и рака ободочной кишки человека.

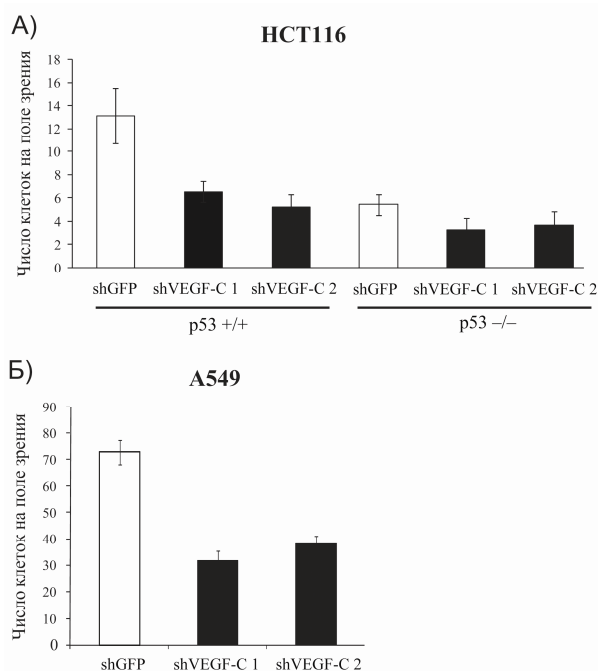


Рис. 3. Влияние подавления экспрессии *VEGF-C* на миграционную способность HCT116 (А) и A549 (Б): Клетки рассеивали в камеры Бойдена с диаметром пор 8 мкм, миграция оценивалась подсчетом клеток, прошедших через поры, как описано в разделе «Материалы и методы». Представлены типичные данные одного из трех экспериментов.

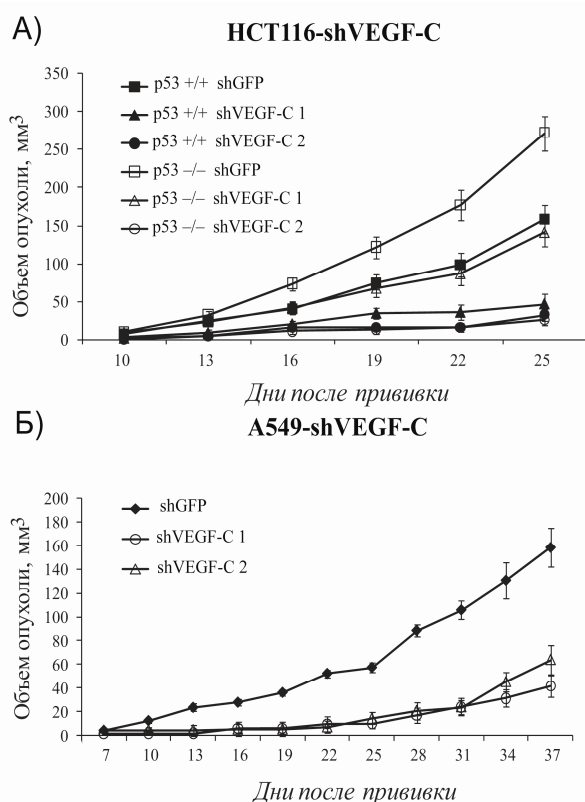


Рис. 4. Влияние подавления экспрессии *VEGF-C* на скорость роста подкожных ксенографтов клеток HCT116 (А) и A549 (Б) в бестимусных мышах: Прививку опухолевых клеток и измерение размеров опухолей проводили, как описано в разделе «Материалы и методы». Приведены типичные данные, полученные при анализе 8–12 опухолей в каждом из трех экспериментов.

Ингибирование скорости роста опухолевых клеток с подавленной экспрессией *VEGF-C* наблюдалось не только в культурах *in vitro*, но и *in vivo* при подкожной прививке иммунодефицитным мышам. При этом существенное торможение опухолевого роста обнаруживалось во всех исследованных линиях клеток вне зависимости от сохранения в них активности опухолевого супрессора *p53* (рис. 4).

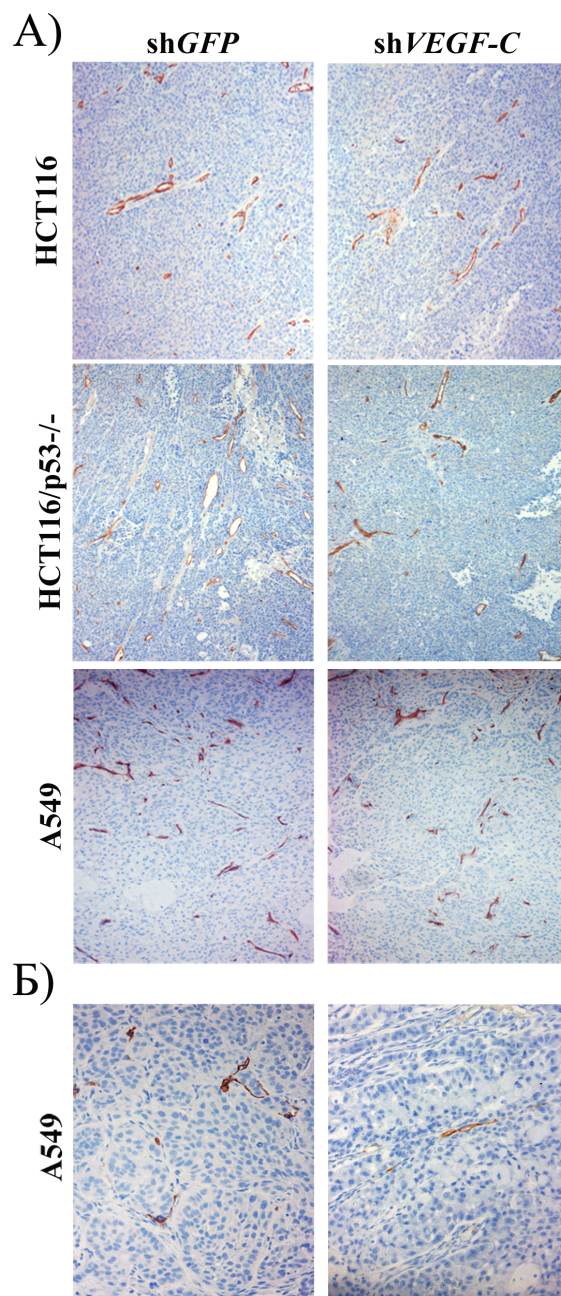


Рис. 5. Иммуногистохимическое окрашивание срезов опухолей HCT116 и A549 антителами на CD34 (А) и LYVE-1 (Б). Представлены типичные поля зрения.

Замедление опухолевого роста могло быть связано не только с прерыванием аутокринной стимуляции пролиферации неопластических клеток, но и с ингибированием образования в опухолях кровеносных сосудов вследствие способности *VEGF-C* к низкоаффинным взаимодействиям с *VEGFR-2* [16]. Для проверки этого предположения был проведен анализ срезов опухолей, окрашенных антителами на CD34 – маркер кровеносного эндотелия (см. рис. 5А).

Мы обнаружили, что подавление экспрессии VEGF-C не оказывает достоверного эффекта на содержание кровеносных сосудов в опухолях, формируемых p53⁺ клетками A549 и HCT116, тогда как в p53⁻ опухолях HCT116/p53^{-/-}, в которых уровень экспрессии VEGF-C исходно ниже (см. выше), дополнительное ингибирование VEGF-C приводит к уменьшению количества крупных сосудов и сосудов с просветами (см. табл.). Таким образом, не исключено, что при невысоком уровне продукции VEGF-C подавление его синтеза/функции может тормозить опухолевый рост как за счет ингибирования аутокринной стимуляции пролиферации неопластических клеток, так и за счет уменьшения их гемангиогенной активности.

Согласно общепринятым представлениям основная функция VEGF-C заключается в индукции лимфангиогенеза.

Мы решили проверить, влияет ли подавление синтеза VEGF-C на лимфангиогенную активность опухолевых клеток.

При иммуногистохимическом окрашивании антителами против LYVE-1 – маркера лимфатического эндотелия – мы обнаружили, что в опухолях, формируемых клетками линии HCT116, лимфатические сосуды не образуются. Поэтому на таких опухолях влияние инактивации VEGF-C на лимфангиогенез оценено быть не могло. Следует заметить, что на клеточной линии рака толстой кишки LoVo была продемонстрирована способность siVEGF-C ингибировать опухолевый лимфангиогенез [3].

С другой стороны, в подкожных ксенографтах клеток A549 присутствуют внутриопухолевые лимфатические сосуды. Их подсчет показал, что подавление экспрессии VEGF-C приводит к существенному ингибированию образования внутриопухолевых лимфатических сосудов (см. рис. 5Б, 6). Очевидно, что такой эффект ингибирования функции VEGF-C должен уменьшить вероятность лимфогенного метастазирования опухолевых клеток. Это предположение проходит в настоящее время экспериментальную проверку.

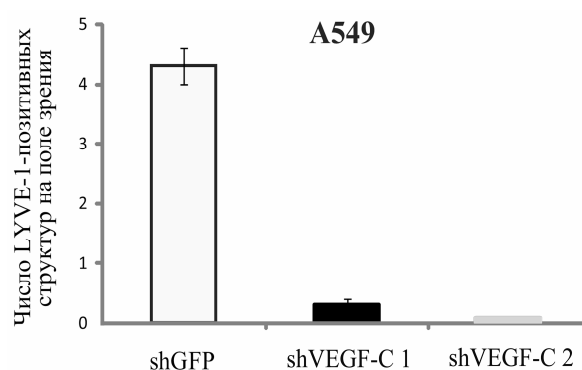


Рис. 6. Влияние подавления экспрессии VEGF-C на лимфангиогенез в подкожных ксенографтах, формируемых клетками линии A549. Подсчет числа LYVE-1-позитивных лимфатических сосудов проводился, как описано в «Материалах и методах».

Заключение

Полученные результаты показывают, что культивируемые *in vitro* клетки рака легкого линии A549 и рака ободочной кишки линии HCT116 экспрессируют мРНК и VEGF-C, и его рецептора VEGFR-3. Подавление экспрессии VEGF-C в этих клетках, ингибируя аутокринный и паракринный механизмы регуляции, уменьшает их миграционную способность *in vitro*, скорость роста *in vitro* и *in vivo*, гемангиогенную и лимфангиогенную активность *in vivo*. Вероятно, VEGF-C может быть перспективной молекулярной мишенью для таргетной терапии рака легкого и рака ободочной кишки человека.

Работа поддержана грантами Российского Федерального Агентства по науке и инновациям (контракты № 02.512.11.2102 и № 02.512.11.2195), РФФИ, и Программы поддержки фундаментальных работ по онкологии Центра внедрения ПРОТЕК.

Таблица

Влияние подавления экспрессии VEGF-C на ангиогенную активность клеток линии A549 и сублиний HCT116 при формировании подкожных ксенографтов в бестимусных мышах

Ксенографты	Крупные (>100мкм) сосуды	Сосуды с просветами	CD34 ⁺ структуры без просветов
A549-shGFP	4,7 ± 0,3	10,7 ± 1,5	8,7 ± 2,1
A549-shVEGF-C 1	3,4 ± 0,5	8,6 ± 2,0	10,9 ± 1,9
A549-shVEGF-C 2	3,8 ± 0,4	8,7 ± 1,8	14 ± 1,8
HCT116-shGFP	1,6 ± 0,5	8,9 ± 2,0	10 ± 3,2
HCT116-shVEGF-C 1	2,3 ± 0,3	9,5 ± 1,5	10,2 ± 2,2
HCT116-shVEGF-C 2	2,0 ± 0,4	8,5 ± 1,8	16 ± 2,8
HCT116(p53 ^{-/-})-shGFP	4,2 ± 0,2	15 ± 1,1	10 ± 2,9
HCT116(p53 ^{-/-})-shVEGF-C 1	3,3 ± 0,3	10,4 ± 1,4	8,5 ± 2,5
HCT116(p53 ^{-/-})-shVEGF-C 2	2,2 ± 0,5	9,1 ± 1,5	11,2 ± 2,0

Литература

1. Asahara T., Takahashi T., Masuda H. et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells // *EMBO J.* – 1999. – Vol. 18. – P. 3964–72.
2. Bachelder R.E., Wendt M.A., Mercurio A.M. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4 // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62. – P. 7203–6.
3. He X., Yu X., Liu T. et al. Vector-based RNA interference against vascular endothelial growth factor-C inhibits tumor lymphangiogenesis and growth of colorectal cancer *in vivo* in mice // *Chinese Medical J.* – 2008. – Vol. 121. – P. 439–44.
4. Jackson M.W., Roberts J.S., Heckford S.E. et al. A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62. – P. 854–9.
5. Ji R.C. Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: new insights into intratumoral and peritumoral lymphatics // *Cancer Metastasis Rev.* – 2006. – Vol. 25. – P. 677–94.
6. Kamba T., McDonald D.M. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer // *Br J Cancer.* – 2007. – Vol. 96. – P. 1788–95.
7. Khromova N., Kopnin P., Stepanova E. et al. p53 hot-spot mutants increase tumor vascularization via ROS-mediated activation of the HIF-1/VEGF-A pathway // *Cancer Lett.* – 2009. – Vol. 276. – P. 143–51.
8. Kobayashi S., Kishimoto T., Kamata S. et al. Rapamycin, a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin, suppresses lymphangiogenesis and lymphatic metastasis // *Cancer Sci.* – 2007. – Vol. 98. – P. 726–33.
9. Kodama M., Kitadai Y., Tanaka M. Vascular endothelial growth factor C stimulates progression of human gastric cancer via both autocrine and paracrine mechanisms // *Clin Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14. – P. 7205–14.
10. Kopnin P.B., Agapova L.S., Kopnin B.P. et al. Repression of sestrin family genes contributes to oncogenic Ras-induced reactive oxygen species up-regulation and genetic instability // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – P. 4671–8.
11. Laakkonen P., Waltari M., Holopainen T. et al. Vascular endothelial growth factor receptor 3 is involved in tumor angiogenesis and growth // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – P. 593–9.
12. Lien S., Lowman H.B. Therapeutic anti-VEGF antibodies // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 181. – P. 131–50.
13. Lyden D., Hattori K., Dias S. et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth // *Nat. Med.* – 2001. – Vol. 7. – P. 1194–201.
14. von Marschall Z., Cramer T., Hocker M. et al. De novo expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer: evidence for an autocrine mitogenic loop // *Gastroenterology.* – 2000. – Vol. 119. – P. 1358–72.
15. Sablina A.A., Chumakov P.M., Kohnin B.P. Tumor-suppressor p53 and its homologue p73a affect cell migration // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 27362–71.
16. Shibuya M., Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis // *Exp. Cell. Res.* – 2006. – Vol. 312. – P. 549–60.
17. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis // *J. Biochem. Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 39. – P. 469–78.
18. Su J.L., Yen C.J., Chen P.S. et al. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression // *Br. J. Cancer.* – 2007. – Vol. 96. – P. 541–5.
19. Timoshenko A.V., Rastogi S., Lala P.K. Migration-promoting role of VEGF-C and VEGF-C binding receptors in human breast cancer cells // *Br. J. Cancer.* – 2007. – Vol. 97. – P. 1090–8.
20. Wissmann C., Detmar M. Pathways targeting tumor lymphangiogenesis // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12. – P. 6865–8.
21. Wong S., Haack H., Crowley D. et al. Tumor-secreted vascular endothelial growth factor-C is necessary for prostate cancer lymphangiogenesis, but lymphangiogenesis is unnecessary for lymph node metastasis // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65. – P. 9789–98.

Н.В. Плявник, Г.А. Серебренникова

ДИЗАЙН КАТИОННЫХ ЛИПИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ПОЛИЕНАСЫЩЕННЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ НАНОЧАСТИЦ

МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва

Введение. Одним из подходов к лечению рака является использование липидов с простой эфирной связью. Так, коммерчески доступный зарубежный препарат Эдельфозин, основой которого является липид с короткоцепным заместителем при С-2 атоме глицерина, успешно прошел клинические испытания по ингибированию роста различных видов опухолей. Существенным недостатком Эдельфозина является его способность служить инициатором гемолиза, поэтому актуальной задачей является поиск новых липидов алкильного типа, не проявляющих гемолитической активности и обладающих высокими противоопухолевыми свойствами.

Цель исследования. В результате проведенных исследований планируется получить новые катионные глицеролипиды, содержащие в гидрофобной области полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), которые, как известно, способны оказывать противоопухолевое действие. При попадании подобных липидов в клетку в результате гидролиза сложноэфирной связи образуется свободная ПНЖК и положительно заряженный лизоглицеролипид – бесфосфорный аналог Эдельфозина.

Включение липидов такого типа в липосомальные наночастицы приводит к значительному увеличению времени циркуляции их в русле кровотока и снижению гемолитической активности

Материалы и методы. Создание липидов будет осуществляться на основе функционально ориентированного дизайна, который включает в себя поиск и оптимизацию новых универсальных методов синтеза бесфосфорных положительно заряженных глицеролипидов, содержащих остаток полиненасыщенной жирной кислоты в С(2) положении глицерина.

Результаты. К настоящему времени с выходом 74 % синтезирован *rac*-1-октадецил-3-(*mpem*-бутилдифенилсилил)глицерин. Введение остатка ПНЖК в С(2) положении глицерина в условиях реакции Мицунобу и удаление защитной группы приведет к ключевому диглицериду, содержащему длинноцепной алкильный и полиненасыщенный ацильный заместители, на основе которого можно синтезировать противоопухолевые катионные липиды с различными полярными «головками и спейсерными группами».

Выводы. На данном этапе разработан метод получения замещенного диглицерида для селективного введения остатка полиненасыщенной жирной кислоты в С(2) положение глицеринового скелета.

УДК 616-006:616-097.3:615.37

*Е.Ф. Чмутин, П.К. Иванов, А.С. Гриневиц***РАЗРАБОТКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ОНКОЛОГИИ: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ**

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация:

Чмутин Евгений Федорович, канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей.

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(499)612-96-16**e-mail:** echmutin@yandex.ru

Статья поступила: 16.03.2009 г., принята к печати: 23.09.2009 г.

Резюме

В обзоре рассматриваются достигнутые к настоящему времени успехи в создании противоопухолевых средств на основе моноклональных антител, кратко описываются существующие препараты, разрешенные к применению по онкологическим показаниям (Мабтера, Герцептин, Zevalin, Веххар, Mylotarg, Авастин, Кэмпас, Эрбитукс, Vectibix), и обсуждаются наиболее перспективные направления дальнейших разработок и исследований в этой области.

Ключевые слова: направленная терапия, моноклональные антитела, онкология.*E.F. Chmutin, P.K. Ivanov, A.S. Grinevich***DEVELOPMENT OF THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES FOR ONCOLOGY: ACHIEVEMENTS AND PERSPECTIVES**

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

Abstract

A review summarizes the recent success in the development of new anticancer drugs based on monoclonal antibody technology. We describe briefly the anticancer monoclonal antibodies in use such as MabThera, Herceptin, Zevalin, Bexxar, Mylotarg, Avastin, Campath, Erbitux, Vectibix. In conclusion, we discuss the most promising directions of future research in this area.

Key words: targeted therapy, monoclonal antibodies, oncology.**Введение**

Традиционно системная терапия солидных и гематологических опухолей проводится с помощью цитотоксических химиопрепаратов, благоприятный клинический эффект которых неизбежно сопровождается рядом отрицательных факторов, в том числе – токсичностью для нормальных тканей и развитием резистентности с потерей клинического эффекта. Поэтому постоянно ведутся разработки новых средств лечения, которые бы более селективно воздействовали на опухолевые клетки и обладали лучшей эффективностью и переносимостью, чем существующие препараты.

Основным принципом таких исследований в последнее время является движение «от мишени к ружью», т.е. первоначальный поиск и выбор мишеней для воздействия на опухолевые клетки, и затем поиск средств, позволяющих воздействовать на эти мишени. В отличие от традиционных средств химиотерапии, средства, созданные по такому принципу, получили общее название «средств направленной терапии».

Как известно, опухолевые клетки отличаются от нормальных по экспрессии различных факторов, обеспечивающих нечувствительность опухолевых клеток к действию индукторов апоптоза и ингибиторов роста и деления, способность к неограниченному делению, метастазированию и инвазии в ткани [18].

Хотя характер экспрессии этих факторов различается при разных типах опухолей и у разных больных, в целом, они могут служить мишенями для воздействия на опухолевый процесс у значительной части больных.

Возможность направленного, селективного воздействия на опухолеспецифичные антигены появилась в конце 1970-х гг. благодаря разработке гибридной технологии получения моноклональных антител – высокочистых препаратов антител против какого-либо одного антигена [28].

По этой технологии получают гибридные клетки путем слияния клеток лимфомы мыши, обладающих способностью к бесконечному делению, и лимфоцитов мыши, иммунизированной соответствующим антигеном. После слияния отбирают одну гибридную клетку, секретирующую необходимые антитела, и размножают ее до культуры, которая и является источником антител.

Поскольку все клетки в культуре являются потомками (клоном) одной исходной гибридной клетки, то получаемые антитела называют моноклональными. Моноклональные антитела селективно взаимодействуют только с антигеном, использованным для первичной иммунизации, и благодаря этому они приобрели особое значение как средства направленной терапии.

Однако МКА, которые представляют собой мышиные иммуноглобулины, имеют ряд существенных недостатков как лекарственные препараты.

При многократном введении человеку они вызывают формирование человеческих противомышьяных антител, которые нейтрализуют МКА, снижая их эффективность, и вызывают аллергические реакции, вплоть до анафилаксии [44]. Эти недостатки были впоследствии в значительной степени преодолены путем применения технологии рекомбинантной ДНК для создания клеток-продуцентов МКА. Эта технология позволила создать МКА с разной долей мышьяного компонента в молекуле иммуноглобулина, вплоть до ограничения этого компонента только антиген-распознающим участком.

В зависимости от доли мышьяного белка, различают химерные МКА (мышьяный вариабельный домен иммуноглобулина, 10–35 % белка) и гуманизированные МКА (мышьяный антиген-распознающий участок, ~ 5 % белка) [23; 59]. В последнее время предпринимаются попытки создания полностью человеческих рекомбинантных МКА с использованием генетически модифицированных мышьяей и синтетических иммуноглобулинов человека [43]. Благодаря перспективности данного направления и вложению значительных средств фармацевтическими компаниями, за 2 десятилетия были созданы и изучены в предклинических исследованиях сотни МКА к различным антигенам, десятки из них дошли до стадии клинических испытаний, и целый ряд МКА уже получили разрешение на применение в качестве лекарственных средств.

Первый противоопухолевый препарат на основе МКА (Мабтера) был выпущен на рынок в 1997 г., и с тех пор регистрируется примерно по одному новому препарату этой группы в год. В 2004 г. нами был выполнен обзор имевшихся на тот момент достижений в создании противоопухолевых МКА [1]. Здесь кратко описываются новые созданные с тех пор препараты и изменение статуса существующих.

В 2004 г. были разрешены для применения 8 препаратов противоопухолевых МКА, из них два – ритуксимаб и трастузумаб – были зарегистрированы в РФ (с тех пор их статус не изменился).

Два применявшихся в 2004 г. МКА – эдроколомаб (Panogex) и денилейкин дифитокс (Ontak) – сошли со сцены.

Один представлял собой первое поколение мышьяных МКА, направленных против антигена эпителиальной ткани Ер-САМ, и ограниченно применялся в Германии для лечения рака толстой кишки стадий 2В и С по Dukes [30; 45]. Препарат оказался высоко иммуногенным, и, несмотря на показанную в клинических исследованиях эффективность, был снят с производства.

Ontak представлял собой иммунотоксин, в котором в качестве вектора направленной доставки использовались МКА к рецептору ИЛ-2, а в качестве токсина – дифтерийный токсин с удаленным участком связывания. Препарат был разрешен в США для лечения кожной Т-клеточной лимфомы, нечувствительной к другим видам терапии [15; 58]. Препараты этой группы в целом характеризуются высокой токсичностью, и Онтак был вытеснен другими, более безопасными средствами лечения.

В то же время после 2004 г. появились 3 новых противоопухолевых МКА – бевацизумаб, цетуксимаб и пантимуаb. Первые 2 из них, а также применявшийся в 2004 г. алемтузумаб, сейчас разрешены для применения в РФ.

В настоящее время для применения по онкологическим показаниям разрешены 9 МКА (в том числе 5 – в РФ). Данные об этих антителах кратко описаны ниже и суммированы в табл.

Противоопухолевые МКА, разрешенные к применению

Ритуксимаб

Как указывалось выше, ритуксимаб (Мабтера; «Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд», Швейцария) был первым противоопухолевым МКА, который был выпущен на рынок еще в 1997 г. С тех пор Мабтера сохранила за собой лидерство среди препаратов этой группы и занимает первое место по объему продаж (более 2 млрд. \$ в год). Препарат представляет собой химерные антитела против антигена CD20, который экспрессируется на поверхности В-клеток, начиная со стадии пре-В-клеток, и до стадии дифференцированных плазматических клеток. Этот антиген экспрессируется более чем на 95 % опухолевых клеток В-клеточных НХЛ, и отсутствует в моноцитах, Т-лимфоцитах и клетках нелимфоидного ряда. Препарат разрешен в РФ для лечения В-клеточной НХЛ (рецидивирующей или химиоустойчивой, низкой степени злокачественности или фолликулярной) у взрослых больных.

При применении Мабтеры в стандартной дозировке (4×250 мг/м² в/в с интервалом в 1 нед) в ключевом исследовании в рамках II фазы клинических у больных рецидивирующей НХЛ низкой степени злокачественности или фолликулярной В-клеточной НХЛ, ранее получавшие много линий терапии, частота ОЭ составила 46–48 % с медианой длительности эффекта 12 мес [33]. При удлинении срока применения препарата частота достижения клинического эффекта увеличивалась до 60 % [41]. При повторном применении Мабтеры после развития рецидива у 40 % больных снова достигался эффект (11 % – полный, 30 % – частичный) с медианой длительности 16,3 мес (от 3,7 до 25,1 мес) [13].

Мабтера была также эффективна и безопасна при применении в комбинации со стандартной схемой СVP в 1-й линии терапии больных с CD20⁺-фолликулярной НХЛ: в ключевом исследовании в рамках III фазы клинических испытаний частота эффекта этой комбинации составила 81 %, а частота эффекта одной химиотерапии – 57 % ($p < 0,001$). Добавление Мабтеры значительно увеличивало срок до исчезновения эффекта (соответственно 27 и 7 мес, $p < 0,001$) и не сопровождалось существенным усилением токсичности [32].

В более раннем исследовании частота эффекта Мабтеры, применяемой в комбинации со схемой СНОР в 1 линии терапии больных В-клеточной лимфомы низкой степени злокачественности или фолликулярной В-клеточной лимфомы с плохим прогнозом, достигала 95 % [12].

Имеются сведения об эффективности применения Мабтеры и при НХЛ высокой степени злокачественности (частота клинического эффекта 31 %) [8]. В рандомизированном исследовании в рамках III фазы клинических испытаний показана активность комбинации Мабтеры со схемой СНОР у ранее не леченных больных диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой II–IV стадии в возрасте 60–80 лет [10]. При медиане срока наблюдения 3 года безрецидивная выживаемость больных, получавших эту комбинацию и только химиотерапию, составила 53 и 35 % соответственно, а общая выживаемость – 62 и 51 % соответственно (в обоих случаях $p = 0,008$); это улучшение не сопровождалось усилением токсичности [9]. Предполагается, что ритуксимаб может повышать чувствительность клеток лимфомы к действию химиопрепаратов, хотя точный механизм этого взаимодействия неизвестен [14].

Трастузумаб

Трастузумаб (Герцептин, «Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд», Швейцария) – препарат гуманизированных МКА, направленных против антигена Her2/neu – члена семейства тирозинкиназо-зависимых рецепторов эпидермального фактора роста человека. Этот антиген экспрессирован на эпителиальных клетках протоков молочной железы, яичников, поджелудочной железы и ряда других органов. Гиперэкспрессия антигена Her2/neu наблюдается у 25–30 % больных раком молочной железы и коррелирует с плохим прогнозом заболевания и резистентностью опухоли к химиотерапии [54].

Герцептин был выпущен на рынок на год позже Мабтеры и разрешен в РФ для адъювантной терапии метастатического рака молочной железы с гиперэкспрессией Her2 (монотерапия после одного или более курсов химиотерапии или в комбинации с паклитаксолом в первой линии терапии). Статус препарата с 2004 г. не изменился.

При изолированном применении Герцептина у достигнута частота клинического ответа 12–14 %, причем эффект препарата был выше у больных с наибольшей степенью экспрессии антигена Her2/neu [5].

Добавление Герцептина в схемы первой линии химиотерапии терапии повышает частоту и длительность эффекта, срок до прогрессирования заболевания. В ключевом исследовании в рамках III фазы клинических испытаний с участием ранее не леченных больных метастатическим РМЖ с гиперэкспрессией Her2 частота эффекта, добавление трастузумаба к комбинации адриамицин-циклофосфан повышало частоту эффекта с 42 до 53 %, добавление к таксолу – с 16 до 42 %. При этом срок до прогрессирования заболевания удлинялся соответственно с 6,5 до 9,1 мес и с 4,4 до 11 мес, а общий срок выживания увеличивался с 20,3 до 25,1 месяца [55]. При применении Герцептина в комбинации с цисплатином объективный эффект достигнут у 33 % больных, при этом токсические эффекты цисплатина не усиливались [40]. Частота клинического ответа при применении комбинации Герцептина и цисплатина была выше, чем при применении этих препаратов по отдельности. Усиление трастузумабом эффекта цитостатиков может быть обусловлено вызываемым МКА нарушением репарации повреждений ДНК.

Основной проблемой при применении Герцептина является нарушение функций сердца (кардиотоксичность), которое наблюдается как при монотерапии, так и при комбинированной терапии, особенно у больных, получающих или ранее получавших антрациклины [52]. Возможно, это связано с наличием рецепторов Her2 на кардиомиоцитах [51].

Алемтузумаб

Алемтузумаб (Кэмпас, Schering AG, Германия) представляет собой гуманизированные МКА против CD52-антигена человека, который экспрессируется на поверхности нормальных и малигнизированных В- и Т-лимфоцитов, а также моноцитов, тимоцитов и макрофагов. Связывание антител с антигеном приводит к лизису клеток вследствие фиксации комплемента и развития антитело-зависимой клеточной цитотоксичности. Препарат выпущен на рынок в 2001 г. и разрешен в РФ для лечения хронического В-клеточного ХЛЛ.

При подкожном применении Кэмпаса в первой линии терапии больных В-клеточным ХЛЛ в исследовании в рамках II фазы клинических испытаний частота объективного эффекта составила 87 %, в том числе 19 % – полный и 68 % – частичный эффект [31].

При лечении препаратом больных с рецидивирующим или резистентным ХЛЛ полный или частичный клинический эффект достигнут у 38 % пациентов, причем злокачественные лимфоидные клетки исчезли из крови в 97 % случаев [37]. Многообещающие результаты получены также при лечении больных с рецидивирующим или резистентным Т-пролимфоцитарным лейкозом: ПР длительностью от 5 до 30 мес достигнута у 9 из 15 больных (60 %) [38].

Во многих случаях связывание МКА с соответствующим антигеном не приводит к гибели клеток, и в таких случаях эти МКА могут использоваться как средства направленной доставки токсических агентов в опухоль. К таким препаратам относятся иммунотоксин Mylotarg (Гемтузумаб озогамидин) и радиоиммуноконъюгаты, например, Zevalin (⁹⁰Y-ибритумомаб тиуксетан) и Bexxar (¹³¹I-тозитумомаб). Эти препараты в РФ не зарегистрированы.

Гемтузумаб озогамидин

Гемтузумаб озогамидин (Mylotarg, Wyeth, США) представляет собой МКА к антигену миелоидных клеток CD33, конъюгированные с токсином озогамидином (калхеамицином). Антиген CD33 экспрессирован на бластных клетках миелоидного ряда в 80 % случаев острого миелоидного лейкоза. После связывания МКА с антигеном комплекс интернализуется в клетку, где токсин высвобождается и расщепляет двойную цепочку ДНК.

Mylotarg выпущен на рынок в 2000 г. и применяется для лечения острого миелоидного лейкоза у больных старше 60 лет [7].

В исследовании в рамках II фазы клинических испытаний применение препарата у больных с первым рецидивом острого миелоидного лейкоза приводило к ремиссии у 30 % пациентов с медианой срока безрецидивной выживаемости 7,2 мес. [53]. В целом препарат переносится относительно хорошо, и примерно 40 % больных получали его амбулаторно. Имеются сведения об эффективном применении препарата в комбинации с другими цитостатиками, например, идарубицином и аранозой [4].

⁹⁰Y-ибритумомаб тиуксетан

⁹⁰Y-ибритумомаб тиуксетан (Zevalin; Cell Therapeutics, США) представляет собой мышиные МКА против CD20-антигена В-лимфоцитов человека, конъюгированные с бета-излучателем ⁹⁰Y. Препарат выпущен на рынок в 2002 г. и разрешен в США для лечения рецидивирующей или рефрактерной фолликулярной CD20⁺-трансформированной неагрессивной НХЛ.

В многоцентровом исследовании частота эффекта препарата Zevalin у больных рецидивирующей НХЛ низкой и промежуточной степеней злокачественности составляла 67 %, в том числе 26 % – полный эффект при медиане срока до прогрессирования заболевания более 12 мес [62]. Препарат Zevalin был эффективен у 74 % больных фолликулярной НХЛ, резистентных к немеченому МКА к антигену CD20 (Мабтере). 15 % больных имели полный эффект при сроке до прогрессирования заболевания 6,8 мес [60]. В исследовании в рамках III фазы клинических испытаний частота клинического эффекта препарата Zevalin у больных рецидивирующей или резистентной неагрессивной НХЛ или трансформированной CD20⁺ НХЛ (с поражением менее 25 % клеток костного мозга) достигла 80 %, а при применении немеченого МКА (Мабтера) – только 56 % (полный эффект – соответственно 30 и 16 %) [61].

¹³¹I-тозитумомаб

¹³¹I-тозитумомаб (Веххаг; Corina, Швейцария) тоже содержит мышиные МКА против антигена CD20 В-лимфоцитов, но в этом случае они конъюгированы с ¹³¹I. В исследовании в рамках III фазы клинических испытаний с участием больных резистентной НХЛ или трансформированной НХЛ низкой степени злокачественности частота клинического эффекта препарата Веххаг составила 65 % (в том числе 20 % – полный эффект) с медианой длительности эффекта 6,5 мес [25].

Еще более высокие результаты были получены при применении препарата в первой линии терапии. В этом случае частота эффекта достигала 100 %, в том числе 56 % – полный эффект [24].

Бевацизумаб

Бевацизумаб (Авастин, «Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд», Швейцария) – гуманизированные МКА, направленные против фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A). Бевацизумаб связывается с VEGF и предотвращает взаимодействие VEGF с его рецепторами (Flt-1 и KDR) на поверхности эндотелиальных клеток. Взаимодействие VEGF с его рецепторами приводит к пролиферации эндотелиальных клеток и образованию новых кровеносных сосудов на моделях ангиогенеза *in vitro*. Введение бевацизумаба на моделях трансплантата рака прямой кишки у мышей *nude* приводит к ослаблению васкуляризации и угнетению роста опухоли [47]. Введение бевацизумаба приводит к подавлению метастатического прогрессирования заболевания и снижению микрососудистой проницаемости при различных опухолях человека, включая рак ободочной кишки, молочной железы, поджелудочной железы и предстательной железы. Авастин выпущен на рынок в 2004 г. и разрешен для применения в первой линии терапии метастатического рака толстой/прямой кишки в комбинации с химиотерапией на основе производных фторпиримидина.

В исследовании в рамках III фазы клинических испытаний добавление Авастина к схеме IFL (иринотекан, фторурацил, лейковорин) в первой линии терапии больных с метастатическим РТК достоверно увеличивало частоту эффекта (с 35 до 45 %), медиану срока выживания без прогрессирования заболевания (с 6,2 до 10,6 мес) и медиану общего срока выживания (с 15,6 до 20,3 мес) [20]. Среди больных, получавших Авастин, риск смерти были ниже, чем среди больных, получавшей только терапию по схеме IFL.

При применении Авастина в комбинации с фторурацилом/лейковорином в первой линии терапии больных метастатическим РТК, имеющих противопоказания для терапии иринотеканом (возраст старше 65 лет, предшествующая лучевая терапия брюшной полости и таза) или с меньшей вероятностью получения преимущества от терапии иринотеканом (исходный уровень альбумина $< 3,5$ г/дл), тоже достигнута более высокая частота объективного эффекта (40 % по сравнению с 15,2–16,7 % без Авастина), достоверное увеличение срока выживания без прогрессирования (с 5,2 до 9,2 мес) и тенденция к увеличению общего срока выживания (с 13,6 до 17,7 мес) по сравнению с проведением только химиотерапии фторурацилом/лейковорином.

Имеются также данные об эффективности применения высокой дозы Авастина при метастатическом раке почки [64]. Добавление высокой дозы препарата к комбинации карбоплатина и паклитаксела у ранее не леченных больных местно-распространенным или метастатическим НМРЛ увеличивало частоту эффекта с

19 до 31 %, а медиану срока до прогрессирования заболевания – с 4,2 до 7,4 месяца [22]. В исследовании в рамках III фазы клинических испытаний с участием больных с резистентным к таксанам метастатическим раком молочной железы частота эффекта комбинации Авастина с капецитабином была выше, чем при применении одного капецитабина (соответственно 19,8 и 9,1 %), хотя медиана срока до прогрессирования заболевания в 2 группах больных не различалась [34].

Цетуксимаб

Цетуксимаб (Эрбитукс, Boehringer Ingelheim Pharma, Германия) представляет собой химерное МКА IgG₁, направленное против рецептора EGFR. EGFR – тирозинкиназный рецептор, участвующий в передаче сигналов, регулирующих клеточный цикл, ангиогенез, миграцию клеток и клеточную инвазию/процесс метастазирования. Экспрессия EGFR усилена в клетках опухолей эпителиального происхождения, например, РЛ, РМЖ, РТК; гиперэкспрессия EGFR сопровождается плохим прогнозом [27; 42; 48]. Сродство к EGFR примерно в 5–10 раз превышает сродство эндогенных лигандов. Цетуксимаб блокирует связывание эндогенных лигандов с EGFR, что приводит к ингибированию функций рецептора. Далее комплекс МКА с рецептором интернализуется в клетку, что может приводить к уменьшению количества рецепторов.

Цетуксимаб также сенситизирует цитотоксические иммунные эффекторные клетки в отношении экспрессирующих EGFR опухолевых клеток. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* цетуксимаб тормозил пролиферацию и вызывал апоптоз опухолевых клеток человека, экспрессирующих EGFR. *In vitro* и *in vivo* цетуксимаб подавляет секрецию ангиогенных факторов в опухолевых клетках, блокирует миграцию эндотелиальных клеток и снижает активность неоангиогенеза и метастазирования опухоли.

Эрбитукс выпущен на рынок в 2004 г. и разрешен для применения по следующим показаниям:

- метастатический колоректальный рак в комбинации со стандартной ХТ;
- монотерапия МКРП в случае неэффективности предшествующей ХТ с включением иринотекана или оксалиплатина, а также при непереносимости иринотекана;
- местно-распространенный плоскоклеточный рак головы и шеи в комбинации с ЛТ;
- рецидивирующий или метастатический плоскоклеточный рак головы и шеи в случае неэффективности предшествующей ХТ на основе препаратов платины.

Во II фазе клинических испытаний показана эффективность Эрбитукса, изолированно или в комбинации с иринотеканом, для лечения EGFR⁺мРТК, резистентного к иринотекану [50]. Данные подтверждены в рандомизированном исследовании, которое также показало, что комбинированное применение Эрбитукса и иринотекана более эффективно, чем один Эрбитукс: частота эффекта составляла 22,9 и 10,8 %, срок до прогрессирования – 4,1 и 1,5 мес, а медиана ОВ – 8,6 и 6,9 мес соответственно [11]. На основании этих исследований было дано разрешение на применение препарата в комбинации с иринотеканом при EGFR⁺мРТК, резистентном к иринотекану.

Многообещающие результаты также получены при раке органов головы и шеи, раке поджелудочной железы и НМРЛ [3; 17; 46].

Основным побочным эффектом Эрбитукса является кожная сыпь, которая развивается у 756 % больных и является фактором прогноза эффективности препарата [49].

Панитумумаб

Панитумумаб (Vectibix; Amgen, Швейцария) представляет собой полностью человеческие рекомбинантные МКА против EGFR. Препарат относительно недавно (в 2006 г.) был разрешен для лечения рака толстой/прямой кишки.

В ключевом рандомизированном исследовании в рамках III фазы клинических испытаний с участием больных мРТК, не имевших эффекта стандартной ХТ, 24-недельная выживаемость без прогрессирования при применении панитумумаба (в сочетании с НПТ) составила 18 %, а при проведении одной НПТ – 5 %; через 32 нед лечения эти цифры равнялись 10 и 4 % соответственно. Медиана длительности эффекта равнялась 17 нед, причем исследователи отмечали хорошую переносимость препарата [39]. Более того, препарат хорошо переносили больные, не переносящие аналогичный препарат химерных МКА против EGFR цетуксимаб [29].

Направления будущих исследований

Из приведенных выше описаний противоопухолевых препаратов, внедренных в клиническую практику, видно, что максимален успех препаратов МКА, направленных либо против антигенов В-лимфоцитов (лечение гемобластозов), либо против EGFR/его рецепторов (сólидные опухоли).

С момента появления первых противоопухолевых препаратов на основе МКА количество изучаемых МКА увеличивалось лавинообразно, и в настоящее время в клинических исследованиях изучается больше сотни таких МКА. Можно выделить несколько основных направлений исследований новых МКА:

1. Создание полностью человеческих рекомбинантных МКА для уменьшения побочных эффектов, связанных с наличием мышинового компонента в молекуле иммуноглобулина.

Как указывалось выше, наличие мышинового компонента в молекуле МКА является причиной формирования человеческих противомышиных антител, нейтрализующих МКА в кровотоке и снижающих их эффективность, а также причиной развития аллергических реакций, вплоть до анафилаксии. Хотя у гуманизированных МКА эти недостатки сведены к минимуму, они, тем не менее, существуют и вызывают озабоченность клиницистов. Поэтому предпринимаются попытки создания полностью человеческих рекомбинантных аналогов существующих МКА, которые были бы свободны от этого недостатка. Один такой препарат – панитумумаб – уже разрешен для применения и действительно лучше переносится, чем аналогичные МКА, содержащие мышинный компонент (см. выше).

В скором времени ожидается выход на рынок препарата полностью человеческих рекомбинантных МКА против антигена CD20 В-лимфоцитов офатумумаба (приобретен компанией Glaxo SmithKline, Великобритания). В настоящее время препарат проходит III фазу клинических испытаний для лечения хронического резистентного В-клеточного лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ). В исследовании в рамках II фазы испытаний объективный эффект был достигнут у 13 из 26 пригодных для обследования больных (50 %) при медиане срока до прогрессирования заболевания 23 нед (диапазон 20–31 нед) [36]. Также изучается применение офатумумаба при резистентных к ритуксимабу НХЛ и применение в комбинации с флударабином и циклофосфаном в первой линии терапии ХЛЛ. Хо-

тя прямого сравнения эффективности офатумумаба и ритуксимаба не проводилось, результаты предклинических исследований и исследований *in vitro* позволяют предположить, что офатумумаб может быть более активен в ситуациях слабой экспрессии CD20, а также при резистентности к ритуксимабу.

2. Большим недостатком всех существующих МКА является их высокая стоимость, обусловленная, в первую очередь, большими производственными затратами, которые связаны с технологией рекомбинантной ДНК. Так, например, стоимость месячного лечения Герцептином превышает \$3000, Авастином – \$9000. В связи с этим предпринимаются попытки оптимизации структуры МКА таким образом, чтобы уменьшить затраты на их производство.

Одним из направлений работы в этой области является создание рекомбинантных фрагментов МКА, сохраняющих функции целой молекулы, например, одного варибельного домена. В то время как нативная молекула МКА имеет молекулярный вес порядка 150 кДа, вес фрагментов может колебаться в пределах 6–15 кДа, что дает им целый ряд преимуществ. Такие фрагменты могут кодироваться одним геном, что существенно упрощает создание плазмид и позволяет значительно увеличить синтез белка в клеточных системах. Благодаря этому себестоимость производства может быть снижена на порядок. Помимо удешевления производства, малые фрагменты МКА имеют такие преимущества, как лучшее проникновение в ткани, способность распознавать экранированные эпитопы, меньшая иммуногенная способность, более высокая стабильность в растворе. Более того, можно регулировать время полужизни таких веществ в кровотоке путем их конъюгации с ПЭГ или антителами против альбумина.

Пример таких препаратов Nanobody (Ablynx, Бельгия). Nanobodies (Нанотела) представляют собой одну тяжелую цепь Ig верблюда или ламы и, соответственно, содержат только 1 антиген-распознающий варибельный участок. Технология получения таких фрагментов МКА была применена для создания нанотел против EGFR. Для повышения эффективности блокады EGFR были созданы димеры этого нанотела, а присоединение фрагмента антител против альбумина сыворотки крови мыши позволило увеличить время полужизни полученной гибридной молекулы в плазме крови с 1,5 до 44 ч. Такой биспецифичный, трехкомпонентный препарат полностью блокировал EGFR, подавлял стимулируемую через этот рецептор пролиферацию клеток и замедлял рост трансплантата солидной опухоли у мышей *nude* [36].

В настоящее время на разных стадиях разработки находится большое количество препаратов на основе фрагментов МКА. Так, например, II фазу клинических испытаний проходит Fab-фрагмент IgG₁ против EGFR (IMC-11F8, ImClone Systems; sólидные опухоли) и конъюгированный с ПЭГ фрагмент МКА против VEGFR-2 (CDP-791, UCB/ImClone Systems; НМРЛ), а I фазу клинических испытаний проходят одноцепочечный фрагмент биспецифичных МКА против CD19/CD3, содержащий 4 варибельных домена (MT103/MEDI-538, Micromet/MedImmune; НХЛ; 36). Однако исследователи отмечают, что иммунный ответ, вызываемый при связывании таких фрагментов МКА с антигенами, может быть слабее, чем при связывании полного иммуноглобулина, поэтому такие фрагменты могут найти применение скорее как средства направленной доставки в опухоль токсинов или радиоизотопов. Разработки этих конъюгатов продвигаются полным ходом.

Действительно, уже II фазу клинических испытаний проходит созданный Philogen/Schering AG одноцепочечный фрагмент МКА против фибронектина (L19), конъюгированный с ^{131}I (разные формы рака) или с ИЛ-2 (сôлидные опухоли). Также на II фазе клинических испытаний находится одноцепочечный фрагмент МКА против молекулы адгезии эпителиальных клеток EpCAM, конъюгированный с экзотоксином псевдомонады (VB4-845, Viventia Biotech; рак органов головы и шеи, рак мочевого пузыря), а также фрагмент МКА против антигена CD89, конъюгированный с EGF (MDX-214, Medarex; опухоли, экспрессирующие EGF; 36).

3. Помимо создания фрагментов МКА, предпринимаются попытки оптимизации структуры МКА с целью улучшения показателей их связывания с антигеном и стабильности. Так, II фазу клинических испытаний проходят МКА против $\alpha\beta\gamma$ -интегрин с удаленным участком деаминарования (Medi-522, MedImmune; меланома, рак толстой/прямой кишки, рак предстательной железы), а компания Medarex/BioWa, США, проводит I фазу клинических испытаний МКА против антигена CD30 со сниженным содержанием углеводного компонента (MDX-1401; ЛХ; 36).
4. Как указывалось выше, наибольшие успехи достигнуты в клиническом применении МКА, направленных либо против антигенов В-лимфоцитов (для лечения гемобластозов), либо против EGFR или его рецепторов (сôлидные опухоли). Поэтому эти антигены привлекают наибольшее внимание исследователей, и в настоящее время на разных стадиях разработки находится большое количество различных модифицированных МКА против этих антигенов, например, офатумумаб (см. выше), МКА против CD22 эпратузумаб и ^{90}Y -эпратузумаб (HXL), МКА против EGFR ABX-EGF, h-R3 и др [16; 56].

Вместе с тем ведутся активные поиски и исследования других возможных мишеней для воздействия с помощью МКА. К таким антигенам относятся, например, упомянутые выше фибронектин, EpCAM, интегрин, CD89, CD30, а также HLA-DR, опухолеспецифичный антиген клеток рака почки cG250, простат-специфичный мембранный антиген, раково-эмбриональный антиген, антиген Льюиса Y и другие [6; 19; 35; 57; 63].

МКА против этих антигенов показали многообещающие результаты в предклинических и ранних клинических исследованиях, и ожидается, что они могут дойти до стадии клинического применения через 5–10 лет.

Что касается России, то здесь успехи в создании противоопухолевых препаратов на основе МКА довольно скромны. В начале 1990-х гг. в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН под руководством проф. А.Ю. Барышникова была внедрена классическая гибридомная технология получения МКА, которая позволила создать и наработать панель антител против дифференцировочных антигенов лейкоцитов человека и ряда других антигенов клеток человека.

Эти МКА успешно используются для дифференциальной диагностики лейкозов и оценки иммунного статуса пациентов. Была предпринята попытка создания противоопухолевого препарата на основе мышинных МКА против муциноподобного антигена MUC-1, выделенного из жировых глобул женского молока [2]. В предклинических исследованиях эти антитела тормозили рост трансплантата рака толстой кишки человека у мышей *nude* [26]. Однако проведенное в рамках II фазы клинических испытаний исследование применения препарата у больных с поздними стадиями рака молочной железы и других форм опухолей эпителиального генеза (рак толстой кишки, яичника и т.д.) показало лишь скромную эффективность (стабилизация заболевания на срок до 12 нед примерно у трети больных) при выраженных аллергизирующих свойствах препарата [21].

В результате клиническая разработка этого единственного на сегодняшний день отечественного противоопухолевого препарата на основе МКА была прекращена. Возможно, причиной неудачи являлось нормативное требование о включении в исследование только больных с III–IV стадиями рака, для которых исчерпаны другие возможности лечения. Известно, что средства биотерапии относительно малоэффективны в случае массивной сôлидной опухоли из-за слабого проникновения вглубь опухолевой ткани, и такие препараты значительно более эффективны при ранних стадиях заболевания или в отношении остаточной опухоли. Кроме того, могла быть неоптимальна дозировка и схема применения препарата. Следует, однако, учитывать, что ни во время проведения исследования, ни в настоящее время нет данных о клиническом успехе какого-либо противоопухолевого препарата на основе МКА к муциноподобным антигенам.

Заключение

Накопленный к настоящему времени мировой опыт разработки и клинического применения противоопухолевых средств на основе МКА указывает на перспективность этого направления.

Хотя подобные исследования требуют очень больших вложений, интерес к ним подогревается коммерческим успехом ряда препаратов: общий объем продаж «большой тройки» швейцарской компании Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд (Мабтера, Герцептин, Авастин) в 2006 г. превысил \$5 млрд.

Из-за чрезвычайно высокой стоимости таких препаратов особое значение приобретает развитие технологий получения гуманизированных МКА в РФ для создания отечественных аналогов импортных лекарств.

Хотя некоторые усилия в этом направлении предпринимаются, существующих средств и ресурсов явно недостаточно, и достижение успеха целиком и полностью зависит от поддержки этих усилий на государственном уровне.

Такая поддержка тем более необходима, что задача снабжения населения лекарствами является государственным приоритетом.

МКА, разрешенные для применения по онкологическим показаниям

Антитело	Целевой антиген	Показание к применению	Год выпуска, производитель
Ритуксимаб (Мабтера*)	CD20	Неходжкинская лимфома	1997, Ф. Хоффманн-Ля Рош
Трастузумаб (Герцептин*)	HER2 (C-erb2)	Рак молочной железы	1998, Ф. Хоффманн-Ля Рош
Гемтузумаб озогамицин (Mylotarg)	CD33	Острый миелоидный лейкоз	2000, Wyeth
⁹⁰ Y-ибритумомаб тиуксетан (Zevalin)	CD20	Неходжкинская лимфома	2002, Cell Therapeutics
¹³¹ I-тозитумомаб (Беххаг)	CD20	Неходжкинская лимфома	2003, Corixa
Алемтузумаб (Кэмпас*)	CD52	Хронический В-клеточный ЛЛ	2001, Genzyme/Schering AG
Бевацизумаб (Авастин*)	VEGF	Метастатический рак толстой/прямой кишки	2004, Ф. Хоффманн-Ля Рош
Цетуксимаб (Эрбитукс*)	EGFR	Рак толстой/прямой кишки	2004, Ф. Хоффманн-Ля Рош
Панитумумаб (Vectibix)	EGFR	Рак толстой/прямой кишки	2006, Amgen
*Зарегистрированы в РФ HER2 – рецептор эпидермального фактора роста человека (EGFR) 2 типа; VEGF – эндотелиальный фактор роста сосудов			

Литература

1. Барышников А.Ю., Иванов П.К., Чмутин Е.Ф. Создание противоопухолевых препаратов на основе моноклональных антител: предпосылки и достижения // Вестник РАМН. – 2004. – Т. 12. – С. 10–6.
2. Якубовская Р.И., Коростелева М.Д., Александр С.К. Выделение мембранных антигенов эпителиальных клеток молочной железы из мембран жировых глобул женского молока // Вопр. мед. химии. – 1986. – Т. 32. – С. 36–41.
3. Abbruzzese J., Rosenberg A., Xiong Q. et al. Phase II study of antiepidermal growth factor receptor (EGFR) antibody cetuximab (IMC-C225) in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer // Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. – 2001. – Vol. 20. – P. 130a.
4. Alvarado Y., Tsimberidou A., Kantarjian H. et al. Pilot study of Mylotarg, idarubicin and cytarabine combination regimen in patients with primary resistant or relapsed acute myeloid leukemia // Cancer Chemother. Pharmacol. – 2003. – Vol. 51(1). – P. 87–90.
5. Baselga J., Tripathy D., Mendelsohn J. et al. Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (Herceptin) in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer // Semin. Oncol. – 1999. – Vol. 4 (Suppl 12). – P. 78–83.
6. Boghaert E.R., Sridharan L., Armellino D.C. et al. Antibody-targeted chemotherapy with the calicheamicin conjugate hu3S193-N-acetyl gamma calicheamicin dimethyl hydrazide targets Lewis y and eliminates Lewis y-positive human carcinoma cells and xenografts // Clin Cancer Res. – 2004. – Vol. 10. – P. 4538–49.
7. Bross P.F., Beitz J., Chen G. et al. Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia // Clin. Cancer Res. – 2001. – Vol. 7. – P. 1490–6.
8. Coiffier B., Haioun C., Ketterer N. et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study // Blood. – 1998. – Vol. 92(6). – P. 1927–32.
9. Coiffier B., Herbrecht R., Tilly H. et al. GELA study comparing CHOP and R-CHOP in elderly patients with DLCL: 3-year median follow-up with analysis according to co-morbidity factors // Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. – 2003. – Vol. 22. – P. 596.
10. Coiffier B., Lepage E., Briere J. et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma // N. Engl. J. Med. – 2002. – Vol. 346. – P. 235–42.
11. Cunningham D., Humblet Y., Sienas S. et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan refractory metastatic colorectal cancer // N. Engl. J. Med. – 2004. – Vol. 351. – P. 337–45.
12. Czuczman M.S., Grillo-Lopez A.J., White et al. Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy // J. Clin. Oncol. – 1999. – Vol. 17(1). – P. 268–76.
13. Davis T., Grillo-Lopez J., White C. et al. Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of retreatment // J. Clin. Oncol. – 2000. – Vol. 18. – P. 3135–43.
14. Demidem A., Lam T., Alas S. et al. Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs // Cancer Biother. Radiopharm. – 1997. – Vol. 12. – P. 177–86.
15. Duvic M., Cather J., Maize J. et al. DAB389IL2 diphtheria fusion toxin produces clinical responses in tumor stage cutaneous T cell lymphoma // Am. J. Hematol. – 1998. – Vol. 58(1). – P. 87–90.
16. Furman R.R., Coleman M., Leonard J.P. Epratuzumab in non-Hodgkin's lymphomas // Curr. Treat. Options. Oncol. – 2004. – Vol. 5. – P. 283–8.
17. Gatzemeier U., Rosell R., Ramlau R. et al. Cetuximab in combination with cisplatin/vinorelbine vs cisplatin/vinorelbine alone in the firstline treatment of patients with epidermal growth-factor receptor expressing advanced non-small-cell lung cancer // Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. – 2003. – Vol. 22. – abstr. 642.
18. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer // Cell. – 2000. – Vol. 100. – P. 57–70.
19. Huland E., Heinzer H. Renal cell carcinoma: novel treatments for advanced disease // Curr. Opin. Urol. – 2003. – Vol. 13. – P. 451–6.
20. Hurwitz H., Fehrenbacher L., Cartwright T. et al. Bevacizumab a monoclonal antibody to vascular-endothelial growth factor prolongs survival in first-line colorectal cancer: results of a phase III trial of bevacizumab in combination with bolus IFL (irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin) as first-line therapy in subjects with metastatic colorectal cancer // Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. – 2003. – Vol. 22. – abstr 3646.

21. *Ivanov P.K., Blokhin D.Y., Chmutin E.F. et al.* Ateonate and Imuteran: Novel Russian monoclonal antibody-based therapeutic agents // *Biotechnology Journal*. – 2007. – Vol. 2(7). – P. 863–70.
22. *Johnson D.H., Fehrenbacher L., Novotny W.F. et al.* Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2004. – Vol. 22. – P. 2184–91.
23. *Jones P.T., Dear P.H., Foote J. et al.* Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse // *Nature*. – 1986. – Vol. 321. – P. 522–55.
24. *Kaminski M., Estes J., Regan D. et al.* Front-line treatment of advanced B-cell low-grade lymphoma with radiolabelled anti-B1 antibody: initial experience // *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* – 1997. – Vol. 16. – P. 15a.
25. *Kaminski M., Zelenetz A., Press O. et al.* Pivotal study of iodine 131 tositumomab for chemotherapy-refractory low-grade or transformed low-grade non-Hodgkin's lymphomas // *J. Clin. Oncol.* – 2001. – Vol. 19. – P. 3918–28.
26. *Karmakova T., Bezborodova O., Nemtsova E., Yakubovskaya R.* Antitumor efficiency of monoclonal antibody in nude mice with xenograft of human colon carcinoma // *Proc. 10th NCI-EORTC Symp., Amsterdam, 1998*, P. 88.
27. *Kim E., Khuri F., Herbst R.* Epidermal growth-factor receptor biology (IMC-C225) // *Curr. Opin. Oncol.* – 2001. – Vol. 13. – P. 506–13.
28. *Kohler G., Milstein C.* Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // *Nature*. – 1975. – Vol. 256. – P. 495–7.
29. *Langerak A., River G., Mitchell E. et al.* Panitumumab monotherapy in patients with metastatic colorectal cancer and cetuximab infusion reactions: a series of four case reports // *Clin. Colorectal. Cancer*. – 2009. – Vol. 8(1). – P. 49–54.
30. *Larrick J.W., Gavilondo J.* Therapeutic antibody technology 97 // *Immunotechnology*. – 1998. – Vol. 3(4). – P. 303–7.
31. *Lundin J., Kimby E., Bjorkholm M. et al.* Phase II trial of subcutaneous anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab (campath-1H) as first-line treatment for patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia // *Blood*. – 2002. – Vol. 100. – P. 768–73.
32. *Marcus R., Imrie K., Belch A. et al.* An international multi-centre, randomised open-label phase III trial comparing rituximab added to CVP chemotherapy to CVP chemotherapy alone in untreated stage III/IV follicular non-Hodgkin's lymphoma // *Blood*. – 2003. – Vol. 102. – abstr. 87.
33. *McLaughlin P., Grillo-Lopez J., White C. et al.* IDEC-C2B8 rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program // *J Clin Oncol.* – 1998. – Vol. 16. – P. 2825–33.
34. *Miller K., Rugo H., Cobleigh M. et al.* Phase III trial of capecitabine plus bevacizumab versus capecitabine alone in women with metastatic breast cancer previously treated with anthracycline and a taxane // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2002. – Vol. 76(suppl). – abstr. 36.
35. *Nanus D.M., Milowsky M.I., Kostakoglu L. et al.* Clinical use of monoclonal antibody HuJ591 therapy: targeting prostate specific membrane antigen // *J. Urol.* – 2003. – Vol. 170. – S. 84–9.
36. *Nyberg K.A.* Next generation monoclonal antibodies // *Oncology Business Review*. – 2007. – November. – P. 36–43.
37. *Osterborg A., Dyer M.J., Bunjes D. et al.* Phase II multicenter study of human CD52 antibody in previously treated chronic lymphocytic leukemia. European Study Group of CAMPATH-1H Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia // *J. Clin. Oncol.* – 1997. – Vol. 15. – P. 1567–74.
38. *Pawson R., Dyer M.J., Barge R. et al.* Treatment of T-cell prolymphocytic leukemia with human CD52 antibody // *J. Clin. Oncol.* – 1997. – Vol. 15. – P. 2667–72.
39. *Peeters M., Balfour J., Arnold D.* Panitumumab – a fully human anti-EGFR monoclonal antibody for treatment of metastatic colorectal cancer // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2008. – Vol. 28(3). – P. 269–81.
40. *Pegram M.D., Slamon D.J.* Combination therapy with trastuzumab (Herceptin) and cisplatin for chemoresistant metastatic breast cancer: evidence for receptor-enhanced chemosensitivity // *Semin Oncol.* – 1999. – Vol. 26. – P. 89–95.
41. *Piro L.D., White C.A., Grillo-Lopez A.J. et al.* Extended Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) therapy for relapsed or refractory low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma // *Ann. Oncol.* – 1999. – Vol. 10(6). – P. 655–61.
42. *Porebska I., Harlozinska A., Bojarowski T.* Expression of the tyrosine kinase activity growth factor receptors (EGFR, ERBB2, ERBB3) in colorectal adenocarcinomas and adenomas // *Tumor Biol.* – 2000. – Vol. 21. – P. 105–15.

43. *Reff M.E., Hariharan K., Braslawsky G.* Future of monoclonal antibodies in the treatment of hematologic malignancies // *Cancer Control*. – 2002. – Vol. 9. – P. 152–66.
44. *Reilly R., Sandhu J., Alvarez-Diez T.M. et al.* Problems of delivery of monoclonal antibodies: pharmaceutical and pharmacokinetic solutions // *Clin Pharmacokinet*. – 1995. – Vol. 28. – P. 126–42.
45. *Riethmuller G., Schneider-Gadicke E., Schlimok G. et al.* // *Lancet*. – 1994. – Vol. 343. – P. 1177–83.
46. *Robert F., Esekiel M., Spencer S. et al.* Phase I study of anti-epidermal growth-factor receptor cetuximab in combination with radiation therapy in patients with advanced head and neck cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2001. – Vol. 19. – P. 3234–43.
47. *Rosen L.S.* Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers // *Cancer Control*. – 2002. – Vol. 9(suppl). – P. 36–44.
48. *Salomon D.S., Brandt R., Ciardiello F., Normanno N.* Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies // *Crit Rev Oncol Haematol*. – 1995. – Vol. 19. – P. 183–232.
49. *Saltz L., Kies M., Abbruzzese J. et al.* The presence and intensity of the cetuximab-induced acne-like rash predicts increased survival in studies across multiple malignancies // *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* – 2003. – Vol. 22. – P. 204.
50. *Saltz L.B., Meropol N.J., Loehrer P.J. Sr. et al.* Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor // *J Clin Oncol*. – 2004. – Vol. 22. – P. 1201–8.
51. *Schneider J.W., Chang A.Y., Rocco T.P.* Cardiotoxicity in signal transduction therapeutics: erbB2 antibodies and the heart // *Semin Oncol*. – 2001. – Vol. 28(suppl). – P. 18–26.
52. *Seidman A., Hudis C., Pierri M. et al.* Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical-trial experience // *J Clin Oncol*. – 2002. – Vol. 20. – P. 1215–21.
53. *Sievers E., Larson R., Stadtmauer E. et al.* Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse // *J. Clin. Oncol.* – 2001. – Vol. 19. – P. 3244–54.
54. *Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G. et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene // *Science*. – 1987. – Vol. 35. – P. 177–81.
55. *Slamon D.J., Leyland-Jones B., Shak S. et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2 // *N. Engl. J. Med.* – 2001. – Vol. 344. – P. 783–92.
56. *Sridhar S.S., Seymour L., Shepherd F.A.* Inhibitors of epidermal-growth-factor receptors: a review of clinical research with a focus on non-small-cell lung cancer // *Lancet Oncol*. – 2003. – Vol. 4. – P. 397–406.
57. *Stockmeyer B., Schiller M., Repp R. et al.* Enhanced killing of B lymphoma cells by granulocyte colony-stimulating factor-primed effector cells and Hu1D10—a humanized human leucocyte antigen DR antibody // *Br. J. Haematol*. – 2002. – Vol. 118. – P. 959–67.
58. *Uckun F.M.* Immunotoxins for the treatment of leukaemia // *Br J Haematol*. – 1993. – Vol. 85(3). – P. 435–8.
59. *Winter G., Harris W.J.* Humanized antibodies // *Immunol Today*. – 1993. – Vol. 14. – P. 243–6.
60. *Witzig T., Flinn I., Gordon L. et al.* Treatment with ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy in patients with rituximab refractory follicular NHL // *J Clin Oncol*. – 2002. – Vol. 20. – P. 3262–9.
61. *Witzig T., Gordon L., Cabanillas F. et al.* Randomised control trial of Yttrium 90-labelled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade follicular or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma // *J. Clin. Oncol.* – 2002. – Vol. 20. – P. 2453–63.
62. *Witzig T., White C., Wiseman G. et al.* Phase I/II trial of IDEC-Y2B8 radioimmunotherapy for treatment of relapsed or refractory CD20(+) B-cell non-Hodgkin's lymphoma // *J. Clin Oncol*. – 1999. – Vol. 17. – P. 3793–803.
63. *Wong J.Y.C., Chu D.Z., Yamauchi D.M. et al.* A phase I radioimmunotherapy trial evaluating 90-yttrium-labelled anti-carcinoembryonic antigen (CEA) chimeric T84.66 in patients with metastatic CEA-producing malignancies // *Clin Cancer Res*. – 2000. – Vol. 6. – P. 3855–63.
64. *Yang J.C., Haworth L., Sherry R.M. et al.* A randomised trial of bevacizumab, an anti-vascular-endothelial growth-factor antibody for metastatic renal cancer // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – Vol. 349. – P. 427–34.

УДК 615.277.3014.21:615.225.3

*В. Боят, Е.А. Оганесян, В.Ю. Балабаньян, Р.Н. Аляутдин***ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ ПАКЛИТАКСЕЛА**

ГОУ ВПО Московская Медицинская Академия им. И.М. Сеченова, Москва

Контактная информация:

Боят Ваня, аспирант кафедры фармакологии фармацевтического факультета.

ГОУ ВПО Московская Медицинская Академия им. И.М. Сеченова, Москва

адрес: 107045, Москва, Костянский переулок 9/10, подъезд 1, кв. 3; **тел.** +7(495)221-70-40; **моб.** +7(910)493-09-35**e-mail:** vzivkovic@mail.ru

Статья поступила: 13.01.2009 г., принята к печати: 23.09.2009 г.

Резюме

Паклитаксел – химиотерапевтическое средство, обладающее низкой растворимостью и малой биодоступностью. Форма паклитаксела для внутривенного введения – Таксол® – имеет выраженные побочные эффекты, обусловленные как самим лекарственным веществом, так и используемыми солюбилизаторами. Токсичность паклитаксела ограничивает круг показаний, и в настоящее время основная сфера применения – только немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, рак молочной железы. Являясь субстратом р-гликопротеина, паклитаксел практически не проникает через гематоэнцефалический барьер и не используется в лечении опухолей головного мозга. В связи с этим разрабатываются лекарственные формы паклитаксела, лишенные указанных недостатков, в частности, описаны его ковалентная модификация, мицеллярные, эмульсионные, липосомальные, микро- и наносомальные формы. В настоящем обзоре описаны подходы к разработке форм паклитаксела для его направленного транспорта в опухолевую ткань, в головной мозг и с целью повышения его биодоступности, с акцентом на коллоидные лекарственные формы. Также систематизирована доступная информация о лекарственных формах паклитаксела, дошедших до клинических испытаний.

Ключевые слова: паклитаксел, лекарственные формы, биодоступность, гематоэнцефалический барьер, эффект повышенной проницаемости капилляров.

*Bojat, E. A. Oganesyanyan, V.Yu. Balabanyan, R.N. Alyautdin***DEVELOPMENT OF THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES FOR ONCOLOGY: ACHIEVEMENTS AND PERSPECTIVES**

Moscow Medical Academy of I.M. Sechenov, Moscow

Abstract

Paclitaxel is a chemotherapeutic agent with very low solubility and oral bioavailability. The formulation for parenteral infusion – Taxol® – possesses severe adverse effects caused by the drug itself and the inactive ingredients used for the drug solubilisation. Paclitaxel toxicity limits its indications, and currently only breast, ovarian and non-small cell lung cancers are the main approved uses. As p-glycoprotein substrate, paclitaxel does not cross blood-brain barrier and is not approved for the treatment of brain tumors. To circumvent these drawbacks, novel formulations of paclitaxel are developed, and covalent modification of paclitaxel, micelles, emulsions, liposomes, micro- and nanoparticles have been described so far. In this review, we discuss the approaches used for the development of the formulations for tumor, brain targeting and increasing oral bioavailability of paclitaxel, with the focus to colloidal systems. The available information on alternative paclitaxel formulations in clinical trials has also been summarized.

Key words: Paclitaxel, drug formulations, bioavailability, blood-brain barrier, EPR-effect.

Введение

Паклитаксел – химиотерапевтическое средство из группы таксанов, ингибитор образования микротрубочек с антиангиогенным и апоптотическим действием. Паклитаксел обладает очень низкой растворимостью в воде и в липидах и, как следствие, низкой биодоступностью, в связи с чем в клинической практике используется только внутривенный путь введения, в частности, препарат Таксол. В Такsole для солюбилизации паклитаксела используется смесь этанол – Cremophor EL (ПЭГилированное производное касторового масла) 1 : 1, которая обладает большим количеством недостатков. Cremophor EL способен вызывать реакцию гиперчувствительности, а также обладает нефро- и нейротоксичностью. Разведение композиции в водном растворе непосредственно перед инфузией ведет к медленной преципитации паклитак-

села, кроме того этанол и Cremophor EL растворяют пластиковые контейнеры для инфузий, в связи с чем необходимо использовать менее доступные стеклянные. Токсичность паклитаксела ограничивает круг показаний к применению, в настоящее время это только НМРЛ, рак яичников, рак молочной железы.

Являясь субстратом р-гликопротеина, паклитаксел не может проходить через гематоэнцефалический барьер и не используется в лечении опухолей головного мозга. В связи с этим, разрабатываются новые лекарственные формы паклитаксела. Новые формы позволяют повысить биодоступность паклитаксела при пероральном введении, расширить спектр его применения и снизить побочные эффекты. В настоящем обзоре мы попытались систематизировать имеющуюся информацию о лекарственных формах паклитаксела, с акцентом на те, которые дошли до стадии клинических испытаний (табл.).

Таблица

Лекарственные формы паклитаксела в клинических испытаниях

Торговое название, компания – разработчик	Характеристика	Механизм действия	МПД, мг/м ²	Показания	Стадия разработки
Внутривенное введение					
Taxol Bristol – Mayers Squibb	Раствор для инфузии. Растворитель - Cremophor EL/спирт	–	135-175	РМЖ, РЯ, НМЛР	Зарегистрирован
Abraxane, ABI-007, nab-Paclitaxel Abraxis BioScience, США	Наночастицы из альбумина	EPR – эффект Транспорт в ткани через рецепторы альбумина	300	РМЖ	Зарегистрирован
				РЛ, РЯ, меланома	В клинических испытаниях
Xyotax, Opaxio, CT-2103 Cell Therapeutics, США	Конъюгат с полиглутаминовой кислотой	EPR – эффект Длительная циркуляция в кровотоке	230-270	РЛ	Подготовка к регистрации
				РЯ, РПК, НХЛ, РМЖ	В клинических испытаниях
Genexol Samyang Pharmaceuticals, Южная Корея	Полимерные мицеллы	EPR – эффект	390	РМЖ, РЖ	Зарегистрирован в Южной Корее В клинических испытаниях в США
				РЛ	В клинических испытаниях
NK105 NanoCarrier, Япония	Полимерные мицеллы	EPR – эффект	180	РЖ	В клинических испытаниях
Tocosol Paclitaxel Sonus Pharmaceuticals, США	Эмульсия, содержащая витамин Е	EPR – эффект Ингибирование р-гликопротеина	–	РМЖ, РМП, РПК, РЛ, РЯ	Клинические испытания прекращены
LEP-ETU, liposome entrapped pacli- taxel easy to use NeoPharm, США	Липосомы	EPR – эффект	325	РМЖ	В клинических испытаниях
Taxoprexin, DHA – paclitaxel Luitpold Pharmaceuticals, США	Конъюгат с докозогексановой кислотой	Эффективный транспорт и интенсив- ный метаболизм жирных кислот опу- холевыми клетками	1100	РП, РЛ, меланома, РПЖ, опухоли почки/ поджелу- дочной железы, РПК	В клинических испытаниях
AI-850 Acusphere, США	Пористые частицы	Быстрое растворение и распределение паклитаксела в опухолевую ткань	250	РМЖ	В клинических испытаниях
Местное введение					
OncoGel, ReGel/paclitaxel Protherics, США	Термочувствительный гель	Затвердевание геля при инъекции в опухоль	–	Опухоли ЦНС Рак пищевода	В клинических испытаниях
Paclimer Guilford Pharmaceuticals, США	Микрочастицы	Контролируемое высвобождение при внутрибрюшинном введении	>1200	РЯ	Клинические испытания прекращены
Nanotax CritiTech, США	Нанокристаллы паклитаксела (без вспомогательных компонентов)	Контролируемое высвобождение при внутрибрюшинном введении	–	Опухоли брюшины РЯ	Планируются клинические испытания
Пероральное введение					
–	Циклоспорин, элакридар – ингиби- торы р-гликопротеина	Ингибирование р-гликопротеина	2×160	Сóлидные опухоли	В клинических испытаниях
Nova12005 Novagali Pharma, Франция	Катионные микроэмульсии	Взаимодействие катионных частиц с отрицательно заряженной мембраной слизистой. Солюбилизация паклитаксела	–	Сóлидные опухоли	В клинических испытаниях

*Данные по состоянию на июль 2008. Источники приведены в тексте статьи

Направленный транспорт в опухолевую ткань

Механизмом, обуславливающим тропность коллоидных частиц к опухолевой ткани, считают так называемый *эффект повышенной проницаемости капилляров (Enhanced permeability and retention effect, EPR-эффект)*. В зависимости от своего размера частицы покидают кровоток в тканях и органах с фенестрированными капиллярами. В норме это органы РЭС, при патологии это воспаленная, инфицированная, а также опухолевая ткани.

EPR-эффект для опухолевой ткани определяется рядом анатомических и патофизиологических факторов, таких как [16; 43]: ангиогенез и гиперваскуляризация, большое количество фенестров, секреция факторов сосудистой проницаемости, неэффективный лимфодренаж, «необратимый» транспорт частиц и макромолекул из кровотока в межклеточное пространство.

Кроме того, пассивное накопление лекарственного вещества в опухолевой ткани тем выше, чем дольше оно циркулирует в кровотоке. Тропность к опухоли можно повысить, используя и физиологические механизмы транспорта, специфичные для эндогенных веществ, в частности, за счет использования человеческого альбумина (Abraxane), длинноцепочечной жирной кислоты (Taxoprexin), полиглутаминовой кислоты (Xyotax).

Наночастицы из альбумина

Abraxane (ABI-007, nab-Paclitaxel, Abraxis BioScience, США) – лекарственная форма паклитаксела на основе наночастиц из альбумина. Гидрофобный паклитаксел находится внутри частиц размером 130 нм и стабилизирован отрицательно заряженными молекулами альбумина. При внутривенном введении они быстро диссоциируют на отдельные комплексы «альбумин-паклитаксел»; транспорт в опухолевую ткань обеспечивается, помимо EPR-эффекта, механизмом, специфичным для альбумина (эндотелиальный транцитоз через рецептор альбумина gp60, интернализация комплекса альбумин-лекарство опухолевыми клетками через остеонектин).

При внутривенном введении мышам с экспериментальной опухолью молочной железы, ABI007 увеличивал накопление паклитаксела в опухолевой ткани на 33 % по сравнению с Таксолом. Клинические испытания также продемонстрировали преимущество ABI007: максимально переносимая доза составила 300 мг/м², что примерно вдвое выше по сравнению с Таксолом.

Дозолимитирующими были побочные эффекты со стороны кроветворной системы, характерные для самого паклитаксела, реакций гиперчувствительности отмечено не было, соответственно, не было необходимости в премедикации пациентам дексаметазоном и антигистаминными препаратами, а длительность инфузии была существенно снижена и составила 30 мин.

В исследованном диапазоне доз фармакокинетика ABI007 носила линейный характер, лекарство быстро и дозозависимо распределялось по тканям в отличие от Таксола, распределение которого нелинейно при высоких дозах препарата в связи с образованием мицелл.

ABI007 продемонстрировал более высокую эффективность при лечении метастатического рака молочной железы по сравнению с Таксолом, и в настоящее время это зарегистрированное показание для Абраксана. Препарат проходит клинические испытания в лечении НМРЛ, РЯ, меланомы [18; 21; 25; 26; 50; 61].

Xyotax

Xyotax (Paclitaxel Polyglumex, Opaxio, CT-2103, Cell Therapeutics, США) – конъюгат паклитаксела с полиглутаминовой кислотой.

Это макромолекулярный комплекс, накопление его в опухолевой ткани обусловлено EPR-эффектом, внутриклеточный транспорт в опухолевую клетку – эффективным эндоцитозом «в обход» р-гликопротеина.

В силу высокой молекулярной массы (40–50 kDa) комплекс не элиминируется почками и длительно циркулирует в кровотоке, причем большая часть паклитаксела находится в конъюгированной форме (в условиях *in vitro*, в течение суток высвободилось только 14 % паклитаксела).

Связанная форма не обладает цитостатической активностью, и противоопухолевый эффект проявляется по мере протеолитического гидролиза полиглутаминовой кислоты с образованием свободного паклитаксела непосредственно в опухолевой клетке. Накопление паклитаксела в опухолевой ткани животных с меланомой B16 было на порядок выше при введении конъюгированного паклитаксела по сравнению со свободным.

Конъюгированная форма была более эффективна и в лечении ряда экспериментальных моделей опухолевых заболеваний. Полиглутаминовая кислота водорастворима, и инфузионное введение Xyotax занимает не более 10–20 мин.

Препарат находится в 3 фазе клинических испытаний для лечения РЛ и РЯ [22; 52; 59; 60].

Genexol

Genexol PM (Samyang Pharmaceuticals, Южная Корея) – мицеллярная форма паклитаксела на основе блок-сополимера полиэтиленгликоля и молочной кислоты. В доклинических испытаниях уровень Genexol PM в опухолевой ткани был вдвое–втрое выше по сравнению с Таксолом при внутривенном введении. Genexol PM продемонстрировал существенно более высокую эффективность на животных моделях рака яичников и молочной железы [32].

В клинических испытаниях, максимально переносимая доза составила 390 мг/м², инфузионное введение препарата возможно без премедикации. Genexol PM более эффективен и менее токсичен по сравнению с Таксолом в лечении рака молочной железы, немелкоклеточного рака легких, в комбинации с цисплатином – рака желудка [30; 31; 38; 53].

NK105

NK105 (NanoCarrier, Япония) – лекарственная форма паклитаксела на основе мицеллярных наночастиц размером 80 нм.

В отличие от ABI007, композиция направлена на более длительную циркуляцию паклитаксела в кровотоке.

Фармакокинетическое исследование на мышам с экспериментальным раком прямой кишки показало, что, по сравнению с немиецеллярной формой паклитаксела, площадь под кривой была в 90 и в 25 раз выше в плазме и в опухолевой ткани, соответственно; NK105 полностью тормозил рост опухоли, а нейротоксичность NK105 была ниже, чем у немиецеллярной формы лекарства.

В клинических испытаниях на пациентах с солидными опухолями, в дозе 180 мг/кг площадь под кривой составила 450 мкг час/мл, что на порядок выше по сравнению с данными, опубликованными для таксола. NK105 будет испытан на пациентах с раком желудка [19; 20; 43; 48].

Taxoprexin

Taxoprexin (DHA – paclitaxel, Luitpold Pharmaceuticals, США) – конъюгированная форма паклитаксела с докозогексановой кислотой – длинноцепочечной жирной кислотой, входящей в состав пищевых липидов. Известно, что жирные кислоты, являясь энергетическими субстратами, усиленно захватываются из кровотока опухолевыми клетками, для которых характерен интенсивный метаболизм. И действительно, для конъюгата паклитаксела с жирной кислотой продемонстрировано восьмикратное накопление в опухолевой ткани мышей с экспериментальной карциномой легких. Конъюгированный паклитаксел не обладает противоопухолевой активностью, то есть для проявления цитостатического эффекта необходимо отщепление жирной кислоты, происходящее непосредственно в опухолевой клетке [6].

Очевидно, именно с этим связана высокая максимально переносимая доза паклитаксела у пациентов с солидными опухолями – 1100 мг/м². Эффективность препарата изучается во второй фазе клинических испытаний для лечения целого ряда опухолевых заболеваний; для злокачественной меланомы DHA – paclitaxel перешел в третью фазу испытаний [22].

Повышение биодоступности при пероральном введении

Известно, что частицы субмикронного размера всасываются из ЖКТ. Это связано с эффективной диффузией наночастиц в слой микроворсинок эпителиальных клеток кишечника, хорошо описанными процессами эндо- и транцитоза наночастиц этими клетками, а также захватом частиц М-клетками пейеровых бляшек. В связи с этим субмикронные частицы широко используются для создания пероральных форм веществ с низкой биодоступностью – сильно гидрофильных (неспособных диффундировать через липидный бислой), либо сильно гидрофобных (нерастворимых в ЖКТ) низкомолекулярных лекарственных веществ, а также протеинов, нуклеиновых кислот [13; 28; 46].

Паклитаксел нерастворим в воде, а также является субстратом р-гликопротеина, экспрессированного на поверхности эпителиальных клеток кишечника, и этим обусловлена его низкая биодоступность. Таким образом, основные подходы, используемые в разработке пероральных форм паклитаксела это его солюбилизация, разработка микро- и/или наносомальных форм, в частности, микроэмульсий и включение в состав лекарственной формы ингибиторов р-гликопротеина.

Ингибирование р-гликопротеина

Роль р-гликопротеина в эффлюксе паклитаксела продемонстрирована в опытах с нокаутными мышами, лишенными этого белка. При пероральном введении паклитаксела мышам биодоступность составляла только к 8 %, уровня же 35–40 % удалось добиться как путем использования ингибитора р-гликопротеина – элакридара, так и введением паклитаксела без ингибитора р-гликопротеина нокаутным мышам [7].

Использование ингибитора р-гликопротеина – циклоспорина А позволило повысить биодоступность паклитаксела с 9,3 до 67 % и с 4 до 28 % при пероральном введении мышам [68]. Сообщалось об эффективном повышении биодоступности паклитаксела у мышей с использованием таких ингибиторов р-гликопротеина как валсподар (аналог циклоспорина а, лишенный иммуносупрессивных свойств, десятикратное повышение биодоступности) [69], верапа-

мил (в три раза на крысах [54]), аналог верапамила KR30031 (с 5 до 35 % на крысах [67]), вещество флавоноидной природы биоханин А (четырёхкратное повышение биодоступности с 4 до 15 % [55]), дофеквидар (двукратное повышение биодоступности с 26 до 49 %, более эффективное торможение роста опухоли на модели меланомы мышей [33]), тиолированный полимер поликарбофилцистеин [11]. Другие вышеописанные ингибиторы р-гликопротеина эффективно повышали всасываемость паклитаксела и в клинических испытаниях [40; 41; 44].

Одним из способов снижения сродства к р-гликопротеину является изменение структуры молекулы паклитаксела, и молекулы – аналоги (тесетаксел, ортатаксел, BMS-275183) продемонстрировали более высокую биодоступность в клинических испытаниях [9].

В описанных выше работ перорально вводили Таксол – коммерческую форму паклитаксела, содержащую токсичный Кремофор EL. Это вещество обуславливает нелинейную фармакокинетику паклитаксела, то есть замедляет его всасывание из желудочно-кишечного тракта на высоких дозах в связи с образованием мицелл [42]. Для солюбилизации паклитаксела предложены, в частности, использование гидроксипропилцеллюлозы для замедления его преципитации из пересыщенного раствора [14], а также капсулированная форма на основе поливинилацетатфталата для его контролируемого высвобождения [70]. Избежать использования Кремофора EL можно и, как указано выше, с использованием микроэмульсий.

Солюбилизация паклитаксела, микроэмульгирование

Компоненты эмульсий, такие как, например, ТПГС-100 сукцинат, во-первых, солюбилизируют паклитаксел, во-вторых, являются ингибиторами р-гликопротеина. Транспорт таких частиц в лимфоузлы и кровоток может проходить по механизму, схожему для всасывания пищевых липидов. В опытах на крысах эмульсионная форма, содержащая ТПГС-100 сукцинат, позволила повысить биодоступность паклитаксела с 10 до 70 % [29]. Схожие результаты получены и в других работах как на животных [14; 54], так и в клинических испытаниях [71; 72]. Пероральная микроэмульсионная форма паклитаксела с положительным зарядом частиц (Nova12005, NovaGali, Франция) успешно прошла первую фазу клинических испытаний. [49].

Простота получения микроэмульсий – их несомненное преимущество, к недостаткам же следует отнести их неустойчивость к лиофилизации, быструю преципитацию паклитаксела [54]. Полимерные наночастицы, в частности, на основе PLGA лишены этих недостатков, однако, насколько нам известно, к настоящему времени нет работ, в которых описано пероральное использование наночастиц из PLGA с паклитакселом.

Преодоление гематоэнцефалического барьера

Гематоэнцефалический барьер в норме непроницаем для большинства известных лекарственных соединений.

Для преодоления ГЭБ используется ряд подходов, и наносомальные лекарственные формы – один из них.

Транспорт лекарственных веществ проходит по нескольким механизмам, причем важную роль играет модификация наночастиц поверхностно активными веществами и апополипротеинами [45].

Роль поверхностно-активных веществ.

В ряде независимых исследований показано, что для эффективного транспорта лекарственных веществ в головной мозг с помощью наночастиц в композицию необходимо дополнительно вводить поверхностно-активные вещества, и в большинстве работ для этой цели использовали полисорбат 80 (Твин 80). Модификация ПБЦА наночастиц, содержащих доксорубин, полисорбатом 80 позволила повысить накопление доксорубина в головном мозге здоровых крыс в 60 раз по сравнению с контрольными формами (ДОКС, ДОКС–полисорбат 80, ДОКС–ПБЦА), использование которых не обеспечивало транспорт лекарственного вещества через ГЭБ [17], показано также влияние полисорбата 80 на накопление собственно полимерных наночастиц [1]. Транспорт доксорубина в головной мозг был еще эффективнее у крыс с экспериментальной глиобластомой, что следует связать с повышенной проницаемостью ГЭБ в этих условиях [2], схожие результаты (накопление доксорубина в здоровой и опухолевых тканях головного мозга) получены для ПЭГилированных ПАЦА-наночастиц [8; 9; 42]. ДОКС–ПБЦА-наночастицы, модифицированные полисорбатом 80, полноксаном 188 эффективны в лечении экспериментальной глиобластомы крыс [3; 62]; использование полисорбата 80 не увеличивало острую токсичность [15] и снижало тестикулярную и кардиотоксичность доксорубина [56].

Роль полисорбата 80 в транспорте наночастиц через ГЭБ показана не только для ПАЦА [58], но и для других полимерных частиц, в частности для наночастиц на основе полимолочной кислоты [64]. Полисорбат 80 повышает накопление в головном мозге наночастиц с хлорамфениколом [23], продемонстрировано также трех-четырёхкратное повышение концентрации в ЦНС таких соединений, как такрин [65] и ривастигмин [66].

Роль аполипопротеинов

Обсуждается также роль рецепторов липопротеинов в транспорте коллоидных частиц в головной мозг. Поверхность частиц, покрытых аполипопротеинами, схожа с поверхностью ЛНП, и наночастицы могут, таким образом, повторять путь ЛНП, то есть обеспечивать транспорт веществ (липидов для ЛНП, лекарств для наночастиц) в головной мозг. Ковалентная или нековалентная модификация наночастиц аполипопротеинами А, В, С обеспечивала эффективный транспорт через ГЭБ и фармакологический эффект для доксорубина, даларгина, лоперамида, тубокурарина, для которых в норме ГЭБ непроницаем [4; 5; 35; 36; 45; 57].

Транспорт паклитаксела через ГЭБ

Паклитаксел, являясь субстратом р-гликопротеина, не проходит через ГЭБ. Разработке мицеллярных, липосомальных, наносомальных форм паклитаксела для преодоления ГЭБ посвящено немало исследований. Так, в эксперименте с перфузией головного мозга продемонстрировано достоверно более высокое накопление паклитаксела в головном мозге при внутривенном введении в составе новой микроэмульсионной формы по сравнению с коммерческой формой – Таксолом [34]. Паклитаксел-содержащие липидные наночастицы были эффективны при экспериментальной модели глиомы, причем противоопухолевый эффект был обусловлен ингибированием р-гликопротеина компонентами таких частиц [12]. Внутривенное введение паклитаксела с ингибитором р-гликопротеина валсподаром существенно

повышало концентрацию паклитаксела в головном мозге и приводило к 90-% торможению роста глиобластомы мышей [10]. Использование ингибиторов р-гликопротеина, селективных для мозговой изоформы этого белка (элакридара и таликридара), позволило снизить накопление паклитаксела в плазме, печени и почках мышей, а соотношение головной мозг/плазма было повышено по сравнению с использованием неселективного валсподара [24]. Продемонстрирован транспорт в головной мозг с использованием конъюгата паклитаксела с меланотрансферинном – белком, взаимодействующим со специфическим рецептором и переносящим через ГЭБ ионы железа [27]. Во многих работах, посвященных преодолению ГЭБ, биологический эффект продемонстрировать не удавалось, и, насколько нам известно, коллоидные лекарственные формы паклитаксела до клинических испытаний для лечения опухолей головного мозга еще не дошли. Описаны импланты для интракраниального введения, обеспечивающие контролируемое высвобождение паклитаксела и химиотерапевтический эффект непосредственно в головном мозге крыс [37; 39].

Формы паклитаксела для местного введения

Полимерные микрочастицы широко используются в качестве матрицы для контролируемого высвобождения лекарственных веществ.

Наиболее популярны частицы на основе биodeградируемых сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA), их ПЭГилированных производных (PLGA-PEG), поликапролактона. Меняя тип, гидрофобность, молекулярную массу полимера, можно менять скорость деградации матрицы и, соответственно, точно регулировать скорость высвобождения лекарственного вещества от нескольких часов и дней до многих месяцев.

Продукты деградации нетоксичны, это либо эндогенные метаболиты (молочная, гликолевая, капроновая кислоты), либо легко выводимые гидрофильные вещества (полиэтиленгликоль). Для нерастворимых в воде веществ, таких как паклитаксел, контролируемого высвобождения можно добиться вообще без использования вспомогательных компонентов, регулируя размер и форму кристаллов вещества. Препараты OncoGel и Nanotax – примеры имплантируемых лекарственных форм паклитаксела.

OncoGel

OncoGel (ReGel/paclitaxel, Protherics, США) – биodeградируемый термочувствительный гель на основе блок-сополимера молочной кислоты и этиленоксида, содержащий паклитаксел, для местного введения непосредственно в опухоль.

Так называемая технология ReGel позволяет солюбилизовать сто- и тысячекратные количества плохо растворимых лекарств по сравнению с массой геля-носителя.

Форма жидкая при комнатной температуре, а при попадании в организм (при инъекции в опухоль) гель необратимо затвердевает и обеспечивает длительное высвобождение лекарственного вещества непосредственно в опухолевой ткани. Высвобождение паклитаксела *in vitro* шло 4–6 нед [73].

Проводятся клинические испытания в лечении первичной мультиформной глиобластомы и рака пищевода. Несомненное преимущество OncoGel – чрезвычайно низкий уровень паклитаксела в системном кровотоке, но это обстоятельство обуславливает неэффективность лекарственной формы при метастазах [51].

Nanotax

Nanotax (CriticTech, США) – нанокристаллы паклитаксела размером 600–700 нм для внутрибрюшинного введения.

Субстанция паклитаксела переводится в нанокристаллическую форму, и в состав конечной лекарственной формы входит только лекарственное вещество без вспомогательных компонентов.

При внутрибрюшинном введении мышам Nanotax всасывался в системный кровоток на порядок медленнее по сравнению с Таксолом, а эффективность в лечении экспериментального рака яичников была существенно выше.

Nanotax будет испытан на пациентах со злокачественными новообразованиями, в частности, с раком брюшины и раком яичников [47; 63].

Литература

1. *Ambruosi A., Yamamoto H., Kreuter J.* Body distribution of polysorbate-80 and doxorubicin-loaded [14C]poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles after i.v. administration in rats // *J. Drug Target.* – 2005. – Vol. 13. – P. 535–542.
2. *Ambruosi A., Khalansky A. S., Yamamoto H. et al.* Biodistribution of polysorbate 80-coated doxorubicin-loaded [14C]-poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles after intravenous administration to glioblastoma-bearing rats // *J. Drug Target.* – 2006. – Vol. 14. – P. 97–105.
3. *Ambruosi A., Gelperina S., Khalansky A. et al.* Influence of surfactants, polymer and doxorubicin loading on the anti-tumour effect of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in a rat glioma model // *J. Microencapsul.* – 2006. – Vol. 23. – P. 582–592.
4. *Alyautdin R.N., Petrov V.E., Langer K. et al.* Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles // *Pharm. Res.* – 1997. – Vol. 14. – P. 325–328.
5. *Alyautdin R.N., Tezikov E.B., Ramge P. et al.* Significant entry of tubocurarine into the brain of rats by adsorption to polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles: an in situ brain perfusion study // *J. Microencapsul.* – 1998. – Vol. 15. – P. 67–74.
6. *Bradley M.O., Swindell C.S., Anthony F.H. et al.* Tumor targeting by conjugation of DHA to paclitaxel // *J. Control Release.* – 2001. – Vol. 74. – P. 233–236.
7. *Bardelmeijer H.A., Beijnen J.H., Brouwer K.R. et al.* Increased oral bioavailability of paclitaxel by GF120918 in mice through selective modulation of P-glycoprotein // *Clin. Cancer Res.* – 2000. – Vol. 6. – P. 4416–4421.
8. *Brigger I., Morizet J., Laudani L. et al.* Negative preclinical results with stealth nanospheres-encapsulated Doxorubicin in an orthotopic murine brain tumor model // *J. Control Release.* – 2004. – Vol. 100. – P. 29–40.
9. *Brigger I., Morizet J., Aubert G. et al.* Poly(ethylene glycol)-coated hexadecylcyanoacrylate nanospheres display a combined effect for brain tumor targeting // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2002. – Vol. 303. – P. 928–936.
10. *Fellner S., Bauer B., Miller D. S. et al.* Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier *in vitro* and *in vivo* // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 110. – P. 1309–1318.
11. *Foger F., Malaivijitnond S., Wannaprasert T. et al.* Effect of a thiolated polymer on oral paclitaxel absorption and tumor growth in rats // *J. Drug Target.* – 2008. – Vol. 16. – P. 149–155.
12. *Garcion E., Lamprecht A., Heurtault B. et al.* A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats // *Mol. Cancer Ther.* – 2006. – Vol. 5. – P. 1710–1722.
13. *Galindo-Rodriguez S.A., Allemann E., Fessi H. et al.* Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of in vivo studies // *Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* – 2005. – Vol. 22. – P. 419–464.
14. *Gao P., Rush B.D., Pfund W.P., Hageman M.J.* Development of a supersaturable SEDDS (S-SEDDS) formulation of paclitaxel with improved oral bioavailability // *J. Pharm. Sci.* – 2003. – Vol. 92. – P. 2386–2398.
15. *Gelperina S.E., Khalansky A.S., Skidan I.N. et al.* Toxicological studies of doxorubicin bound to polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in healthy rats and rats with intracranial glioblastoma // *Toxicol. Lett.* – 2002. – Vol. 126. – P. 131–141.
16. *Greish K.* Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: a royal gate for targeted anticancer nanomedicines // *J. Drug Target.* – 2007. – Vol. 15. – P. 457–464.
17. *Gulyaev A.E., Gelperina S.E., Skidan I.N. et al.* Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles // *Pharm. Res.* – 1999. – Vol. 16. – P. 1564–1569.
18. *Gradishar W.J., Tjulandin S., Davidson N. et al.* Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2005. – Vol. 23. – P. 7794–7803.

Заключение

Зарегистрированных и доступных на рынке лекарственных форм паклитаксела очень немного, в частности, насколько нам известно, отсутствует форма перорального введения; круг показаний довольно узок, далека от разрешения проблема транспорта через ГЭБ для лечения первичных и метастатических опухолей ЦНС. Вместе с тем, разработке лекарственных форм паклитаксела посвящено большое количество исследований. Описаны наносомальные, мицеллярные, липосомальные формы, конъюгаты, импланты, находящиеся в клинических испытаниях для лечения целого ряда опухолей. Это дает основания полагать, что в обозримом будущем на рынке появятся новые, более эффективные и менее токсичные формы паклитаксела.

19. Hamaguchi T., Kato K., Yasui H. *et al.* A phase I and pharmacokinetic study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation // *Br. J. Cancer.* – 2007. – Vol. 97. – P. 170–176.
20. Hamaguchi T., Matsumura Y., Suzuki M. *et al.* NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend in vivo antitumour activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel // *Br. J. Cancer.* – 2005. – Vol. 92. – P. 1240–1246.
21. Hawkins M.J., Soon-Shiong P., Desai N. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2008. – Vol. 60. – P. 876–885.
22. Hennenfent K.L., Govindan R. Novel formulations of taxanes: a review. Old wine in a new bottle? // *Ann. Oncol.* – 2006. – Vol. 17. – P. 735–749.
23. Halder K.K., Mandal B., Debnath M.C. *et al.* Chloramphenicol-incorporated poly lactide-co-glycolide (PLGA) nanoparticles: formulation, characterization, technetium-99m labeling and biodistribution studies // *J. Drug Target.* – 2008. – Vol. 16. – P. 311–320.
24. Hubensack M., Muller C., Hoehrl P. *et al.* Effect of the ABCB1 modulators elacridar and tariquidar on the distribution of paclitaxel in nude mice // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 134. – P. 597–607.
25. Ibrahim N.K., Samuels B., Page R. *et al.* Multicenter phase II trial of ABI-007, an albumin-bound paclitaxel, in women with metastatic breast cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2005. – Vol. 23. – P. 6019–6026.
26. Ibrahim N.K., Desai N., Legha S. *et al.* Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel // *Clin. Cancer Res.* – 2002. – Vol. 8. – P. 1038–1044.
27. Karkan D., Pfeifer C., T Vitalis. Z. *et al.* A unique carrier for delivery of therapeutic compounds beyond the blood-brain barrier // *PLoS. ONE.* – 2008. – Vol. 3. – e2469.
28. Kesiosoglou F., Panmai S., Wu Y. Nanosizing – oral formulation development and biopharmaceutical evaluation // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2007. – Vol. 59. – P. 631–644.
29. Khandavilli S., Panchagnula R. Nanoemulsions as versatile formulations for paclitaxel delivery: peroral and dermal delivery studies in rats // *J. Invest. Dermatol.* – 2007. – Vol. 127. – P. 154–162.
30. Kim T.Y., Kim D.W., Chung J.Y. *et al.* Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies // *Clin. Cancer Res.* – 2004. – Vol. 10. – P. 3708–3716.
31. Kim D.W., Kim S.Y., Kim H.K. *et al.* Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a novel Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, with cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer // *Ann. Oncol.* – 2007. – Vol. 18. – P. 2009–2014.
32. Kim S.C., Kim D.W., Shim Y.H. *et al.* In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy // *J. Control Release.* – 2001. – Vol. 72. – P. 191–202.
33. Kimura Y., Aoki J., Kohno M. *et al.* P-glycoprotein inhibition by the multidrug resistance-reversing agent MS-209 enhances bioavailability and antitumor efficacy of orally administered paclitaxel // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 49. – P. 322–328.
34. Koziara J.M., Lockman P.R., Allen D.D. *et al.* Paclitaxel nanoparticles for the potential treatment of brain tumors // *J. Control Release.* – 2004. – Vol. 99. – P. 259–269.
35. Kreuter J., Shamenkov D., Petrov V. *et al.* Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier // *J. Drug Target.* – 2002. – Vol. 10. – P. 317–325.
36. Kreuter J., Hekmatara T., Dreis S. *et al.* Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain // *J. Control Release.* – 2007. – Vol. 118. – P. 54–58.
37. Kumar N.P., Yung Sheng O.B., Wei X.J. *et al.* In vivo performance of implantable biodegradable preparations delivering Paclitaxel and Etanidazole for the treatment of glioma // *Biomaterials.* – 2007. – Vol. 28. – P. 886–894.
38. Lee K.S., Chung H.C., Im S.A. *et al.* Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2008. – Vol. 108. – P. 241–250.
39. Li Khan W., Wenbin Dang, Betty M. Tyler *et al.* Polylactofate microspheres for Paclitaxel delivery to central nervous system malignancies // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – Vol. 9. – P. 3441–3447.
40. Malingre M.M., Beijnen J.H., Rosing H. *et al.* A phase I and pharmacokinetic study of bi-daily dosing of oral paclitaxel in combination with cyclosporin A // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 47. – P. 347–354.
41. Malingre M.M., Beijnen J.H., Rosing H. *et al.* Co-administration of GF120918 significantly increases the systemic exposure to oral paclitaxel in cancer patients // *Br. J. Cancer.* – 2001. – Vol. 84. – P. 42–47.
42. Malingre M.M., Schellens J.H., Van T.O. *et al.* The co-solvent Cremophor EL limits absorption of orally administered paclitaxel in cancer patients // *Br. J. Cancer.* – 2001. – Vol. 85. – P. 1472–1477.
43. Matsumura Y. Poly (amino acid) micelle nanocarriers in preclinical and clinical studies // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2008. – Vol. 60. – P. 899–914.
44. Meerum Terwogt J.M., Malingre M.M., Beijnen J.H. *et al.* Coadministration of oral cyclosporin A enables oral therapy with paclitaxel // *Clin. Cancer Res.* – 1999. – Vol. 5. – P. 3379–3384.

45. Michaelis K., Hoffmann M.M., Dreis S. et al. Covalent linkage of apolipoprotein e to albumin nanoparticles strongly enhances drug transport into the brain // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2006. – Vol. 317. – P. 1246–1253.
46. Mustata G., Dinh S.M. Approaches to oral drug delivery for challenging molecules // Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst. – 2006. – Vol. 23. – P. 111–135.
47. Nanotax ovarian cancer mouse model. http://www.crititech.com/downloads/mouse_model.pdf.
48. Negishi T., Koizumi F., Uchino H. et al. NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, is a more potent radiosensitising agent compared to free paclitaxel // Br. J. Cancer. – 2006. – Vol. 95. – P. 601–606.
49. Novagali Pharma completes a Phase I clinical trial in oncology with its oral formulation of Paclitaxel. <http://www.novagali.com/media/fichiers/file200610045.pdf>.
50. Nyman D.W., Campbell K.J., Hersh E. et al. Phase I and pharmacokinetics trial of ABI-007, a novel nanoparticle formulation of paclitaxel in patients with advanced nonhematologic malignancies // J Clin. Oncol. – 2005. – Vol. 23. – P. 7785–7793.
51. OncoGel™ for oesophageal and brain cancer. <http://www.protherics.com/Products/oncogel.aspx>.
52. OPAXIO Fact Sheet. <http://www.cticseattle.com/pdf/XYOTAX-facts-4pg.pdf>.
53. Park S.R., Oh D.Y., Kim D.W. et al. A multi-center, late phase II clinical trial of Genexol (paclitaxel) and cisplatin for patients with advanced gastric cancer // Oncol. Rep. – 2004. – Vol. 12. – P. 1059–1064.
54. Peltier S., Oger J.M., Lagarce F. et al. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules // Pharm. Res. – 2006. – Vol. 23. – P. 1243–1250.
55. Peng S.X., Ritchie D.M., Cousineau M. et al. Altered oral bioavailability and pharmacokinetics of P-glycoprotein substrates by coadministration of biochanin A // J. Pharm. Sci. – 2006. – Vol. 95. – P. 1984–1993.
56. Pereverzeva E., Treschalin I., Bodyagin D. et al. Influence of the formulation on the tolerance profile of nanoparticle-bound doxorubicin in healthy rats: focus on cardio- and testicular toxicity // Int. J. Pharm. – 2007. – Vol. 337. – P. 346–356.
57. Petri B., Bootz A., Khalansky A. et al. Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: revisiting the role of surfactants // J. Control Release. – 2007. – Vol. 117. – P. 51–58.
58. Reimold I., Domke D., Bender J. et al. Delivery of nanoparticles to the brain detected by fluorescence microscopy // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2008.
59. Singer J.W. Paclitaxel poliglumex (XYOTAX, CT-2103): a macromolecular taxane // J. Control Release. – 2005. – Vol. 109. – P. 120–126.
60. Singer J.W., Shaffer S., Baker B. et al. Paclitaxel poliglumex (XYOTAX; CT-2103): an intracellularly targeted taxane // Anticancer Drugs. – 2005. – Vol. 16. – P. 243–254.
61. Socinski M. Update on nanoparticle albumin-bound paclitaxel // Clin. Adv. Hematol. Oncol. – 2006. – Vol. 4. – P. 745–746.
62. Steiniger S.C., Kreuter J., Khalansky A.S. et al. Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles // Int. J. Cancer. – 2004. – Vol. 109. – P. 759–767.
63. Study of Intraperitoneal Nanoparticle Paclitaxel in Patients With Peritoneal Malignancies. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00708864?term=Nanotax&rank=1>.
64. Sun W., Xie C., Wang H. et al. Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain // Biomaterials. – 2004. – Vol. 25. – P. 3065–3071.
65. Wilson B., Samanta M.K., Santhi K. et al. Targeted delivery of tacrine into the brain with polysorbate 80-coated poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2008.
66. Wilson B., Samanta M.K., Santhi K. et al. Poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease // Brain Res. – 2008. – Vol. 1200. – P. 159–168.
67. Woo J.S., Lee C.H., Shim C.K. et al. Enhanced oral bioavailability of paclitaxel by coadministration of the P-glycoprotein inhibitor KR30031 // Pharm. Res. – 2003. – Vol. 20. – P. 24–30.
68. Van Asperen J., Van Tellingen O., Van der Valk M.A. et al. Enhanced oral absorption and decreased elimination of paclitaxel in mice cotreated with cyclosporin A // Clin. Cancer Res. – 1998. – Vol. 4. – P. 2293–2297.
69. Van Asperen J., Van Tellingen O., Sparreboom A. et al. Enhanced oral bioavailability of paclitaxel in mice treated with the P-glycoprotein blocker SDZ PSC 833 // Br. J. Cancer. – 1997. – Vol. 76. – P. 1181–1183.
70. Veltkamp S.A., Alderden-Los C., Sharma A. et al. A pharmacokinetic and safety study of a novel polymeric paclitaxel formulation for oral application // Cancer Chemother. Pharmacol. – 2007. – Vol. 59. – P. 43–50.
71. Veltkamp S.A., Thijssen B., Garrigue Lambert J.S.G. et al. A novel self-microemulsifying formulation of paclitaxel for oral administration to patients with advanced cancer // Br. J. Cancer. – 2006. – Vol. 95. – P. 729–734.
72. Veltkamp S.A., Rosing H., Huitema A.D. et al. Novel paclitaxel formulations for oral application: a phase I pharmacokinetic study in patients with solid tumours // Cancer Chemother. Pharmacol. – 2007. – Vol. 60. – P. 635–642.
73. Zentner G.M., Rath R., Shih C. et al. Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs // J. Control Release. – 2001. – Vol. 72. – P. 203–215.

УДК 615.015.44:611.018.74:611.16

А.А. Кладиев¹, Е.В. Степанова², Э.Ш. Соломко², В.А. Кельцев³, Б.Ф. Немцов⁴, А.Ю. Барышников²**АНТИАНГИОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПРОСПИДИНА *IN VITRO***¹«Биотехнологическая компания ТНК», Москва²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва³Самарский Государственный медицинский университет⁴Кировская Государственная медицинская академия**Контактная информация:**

Кладиев Андрей Атикович, генеральный директор ООО «Биотехнологическая компания ТНК».

«Биотехнологическая компания ТНК», Москва

адрес: 107045, Москва, Костянский переулок 9/10, подъезд 1, кв. 3; тел. +7(495)789-91-98

e-mail: prospidin@yandex.ru

Статья поступила: 13.01.2009 г., принята к печати: 23.09.2009 г.

Резюме

Ингибирование ангиогенеза, развития новых кровеносных сосудов из уже существующей кровеносной сети, является перспективным подходом к лечению злокачественных опухолей. Особый интерес представляет возможность использования уже известных и хорошо изученных лекарственных препаратов в качестве ингибиторов неоангиогенеза. В проведенных экспериментах *in vitro* проспидин, отечественный противоопухолевый препарат, ингибировал основные этапы опухолевого ангиогенеза *in vitro*: пролиферацию, миграцию и формирование капиллярно-подобных структур в концентрациях до 0,1 мг/мл. Таким образом, одним из возможных механизмов противоопухолевого действия проспицина является ингибирование ангиогенеза.

Ключевые слова: проспидин, ангиогенез, эндотелиальные клетки.А.А. Kladiev¹, E.V. Stepanova², E.Sh. Solomko², V.A. Keltsev³, B.F. Nemtsov⁴, A.Yu. Baryshnikov²**THE ANTIANGIOGENIC PROPERTIES OF PROSPIDIN *IN VITRO***¹«Biotechcompany TNK», Moscow²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow³Samara State Medical University⁴Kirov State Medical Academy**Abstract**

Inhibition of neo-angiogenesis is an attractive therapeutic target because all solid tumors depend on it to grow. The aim of this study was to identify the new angiogenesis inhibitors among the drugs in clinic' use. Here we show that Prospidin, the Russian anticancer drug, inhibited cell proliferation and migration *in vitro*. Prospidin at the concentration 0,1 mg/ml also inhibited the capillary-like structures. Based on the data obtained, we conclude that one of the explanation of Prospidin' anticancer effect might be its antiangiogenic activity.

Key words: prospidin, angiogenesis, endothelial cells.**Введение**

Современная стратегия химиотерапии опухолей подразумевает активное использование соединений с выраженным действием на отдельные звенья роста и прогрессии злокачественных новообразований. Сегодня ни у кого не вызывает сомнения, что важным механизмом развития и метастазирования опухоли является ангиогенез.

Ангиогенез – процесс формирования новых микрососудов из уже существующих. Дефицит питательных веществ и кислорода, необходимых для роста опухоли, приводит к появлению клонов опухолевых клеток, выделяющих ангиогенные факторы. Высокоангиогенные опухоли имеют больше возможностей индуцировать рост новых сосудов при метастазировании, по сравнению с низкоангиогенными, метастазирующие клоны которых находятся в «дремлющем» состоянии [16; 18].

Экспериментальные исследования *in vivo*, иммуногистохимические и биохимические исследования различных опухолей человека неоднократно демонстрировали зависимость роста опухоли и метастазирования от ангиогенной активности пер-

вичного очага [16; 18]. Исследования последних лет доказали, что оценка ангиогенеза опухоли является независимым прогностическим маркером безрецидивной и общей выживаемости больных различными злокачественными заболеваниями [22].

Присутствие в крови ингибиторов неоангиогенеза способно затормозить рост метастазов, но не первичной опухоли. Например, перевиваемая карцинома легкого Льюис при подкожном росте дает метастазы в легкие, однако эти метастазы остаются в покоем состоянии в виде небольших узелков опухолевых клеток, в которых отсутствуют сосуды (микрометастазы). Причиной этого является высокий уровень ингибиторов в крови (ангиостатина и эндостатина), выделяемых первичной опухолью.

Удаление первичной опухоли приводит к снижению уровня ингибиторов ангиогенеза в крови, что приводит к запуску процессов ангиогенеза в микрометастазах в легких и, соответственно, их быстрому росту [18].

Изучение механизмов регуляции ангиогенеза позволило создать новую стратегию лечения злокачественных новообразований: антиангиогенную терапию [14; 16; 20].

Одной из особенностей антиангиогенной терапии является ее цитостатический эффект. В большинстве исследований показано, что использование такой терапии приводит к задержке роста опухоли, а не к ее регрессии. На сегодняшний день известно более чем 700 соединений, имеющих антиангиогенную активность, более 30 антиангиогенных препаратов проходят различные фазы клинических испытаний. Все они относятся к двум основным классам: прямые и непрямые ингибиторы ангиогенеза [20].

Прямые ингибиторы ангиогенеза (Авастин, Софатиниб) действуют непосредственно на эндотелиальные клетки, блокируя пролиферацию, миграцию и индуцируя апоптоз в активированных эндотелиальных клетках [12; 23]. Показано, что к прямым ингибиторам ангиогенеза не возникает лекарственной резистентности [14; 20].

Непрямые ингибиторы (интерфероны, Герцептин, Талидомид, Целекоксиб и др.) блокируют синтез ангиогенных стимуляторов опухолевыми клетками [15; 19]. Так, они могут предотвращать активность онкогенов, стимулирующих ангиогенез, или блокировать рецепторы на эндотелиальных клетках. Для многих онкогенов доказана возможность активирования синтеза стимуляторов ангиогенеза (особенно VEGF) и блокирования синтеза ингибиторов (например, тромбоспонбин 1) [16; 18].

Появляется все больше экспериментальных данных, что ингибирование ангиогенеза является одним из компонентов противоопухолевой активности многих традиционных цитотоксических препаратов (например, блеомицина, циклофосфамид, доксорубицин, нитрозомочевина и т.д.) [21]. Противоопухолевые препараты воздействуют на делящиеся эндотелиальные клетки так же, как и на опухолевые. Однако эндотелиальные клетки способны восстановиться в течение традиционного перерыва (2–3 нед), который обычно используется в химиотерапии для восстановления функции костного мозга. Так, исследования, проведенные *in vivo*, убедительно показывают, что использование «антиангиогенного режима» введения циклофосфамида – частые инъекции небольшими дозами – имеет преимущество перед традиционным [17]. Кроме того, в этих экспериментах не наблюдалось появления резистентности к препарату, в отличие от традиционного подхода [13].

Однако в клинической практике такой путь пока используется редко. Имеется лишь небольшое количество публикаций о высокой эффективности «антиангиогенных режимов» химиопрепаратов [17].

Особый интерес представляет возможность использования в качестве ингибиторов неоангиогенеза уже известных и хорошо изученных лекарственных препаратов. С этой целью нами было проведено изучение антиангиогенных свойств отечественного цитостатического препарата широкого действия проспидина.

Материалы и методы

В работе использованы культуры эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10, трансформированные вирусом SV40.

В качестве противоопухолевого препарата использовались ампулы проспидина лиофилизированного (0,1 г для инъекций).

Препарат разводился *ex tempore* в стерильной дистиллированной воде непосредственно перед каждым опытом.

Цитотоксическое действие на культуру эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10

Клетки SVEC-4-10 (6×10^4 клеток/мл) вносили в лунки 96-луночного планшета в среде ДМЕМ, содержащей 10% эмбриональной сыворотки, 2мМ глутамин. Спустя 24 ч наносили препарат в различных концентрациях (1–0,0001 мг/мл). Инкубацию с препаратом проводили 24 ч, затем добавляли МТТ в конечной концентрации 0,5 мг/мл. Клетки инкубировали 4 ч, затем среду отбирали и клетки растворяли в ДМСО. Оптическую плотность оценивали на анализаторе иммуноферментных реакций «Униплан» при λ 540 нм, используя DMSO как нулевой контроль. Данный метод позволяет оценить цитотоксическое действие препарата на эндотелиальные клетки.

Ингибирование bFGF-стимулированной пролиферации культуры эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10

Клетки SVEC-4-10 вносили в низкой плотности (15×10^3 клеток/мл) в лунки 96-луночного планшета в среде ДМЕМ, содержащей 10% эмбриональной сыворотки, 2мМ глутамин и 20 нг/мл bFGF. Спустя 24 ч наносили препарат в различных концентрациях (1–0,0001 мг/мл). Инкубацию с препаратом проводим 3 дня, затем добавляли МТТ в конечной концентрации 0,5 мг/мл. Клетки инкубировали 4 часа, затем среду отбирали и клетки растворяли в ДМСО. Оптическую плотность оценивали на анализаторе иммуноферментных реакций «Униплан» при 540 нм, используя DMSO как нулевой контроль. Данный метод позволяет оценить влияние препарата на пролиферативную активность активированных эндотелиальных клеток.

Ингибирование миграции культуры эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10 (метод «раневой поверхности»)

Клетки SVEC-4-10 (3×10^5 клеток/мл) вносили в лунки 24-луночного планшета в среде ДМЕМ, содержащей 10% эмбриональной сыворотки, 2мМ глутамин, и инкубировали до образования монослоя. Затем монослой нарушали путем соскабливания части клеток. В течение 24 ч клетки инкубировали в среде ДМЕМ, содержащей 10% FCS, 2мМ глутамин и нецитотоксические дозы препарата (1–0,0001 мг/мл). В качестве положительного контроля использовали клетки в бессыворотной среде ДМЕМ. Результаты оценивали как процент мигрирующих клеток в опыте по отношению к контролю (клетки в среде ДМЕМ, содержащей 10% эмбриональной сыворотки, 2мМ глутамин). Метод позволяет оценить влияние препарата на миграцию эндотелиальных клеток внутри опухоли.

Ингибирование образования трубчочно-подобных структур эндотелиальными клетками SVEC-4-10

24-луночную плашку покрывали Матригелем (250 мкл/лунка) и инкубировали 20–30 мин при 37 °С до его полной полимеризации. Клетки SVEC-4-10 (5×10^5 клеток/мл) инкубировали в среде ДМЕМ с добавлением нецитотоксических доз препарата (1–0,0001 мг/мл) в течение 30 мин при 37 °С. Затем клетки наносили в лунки и инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 4–5 ч. В качестве положительного контроля использовали клетки, инкубировавшиеся в той же среде без препарата. Оценивали длину трубочек и количество контактов между ними. Данный метод позволяет оценить влияние препарата на формирование первичной капиллярной сети внутри опухоли.

Результаты

Было исследовано влияние препарата проспи-дин на гибель, пролиферацию, миграцию эндоте-лиальных клеток SVEC-4-10 и формирование трубочко-подобных структур в концентрациях 1–0,0001 мг/мл. Экспериментальные данные по каждой концентрации были получены в триплетах в трех независимых экс-периментах.

Проспидин не оказывал цитотоксического дей-ствия на культуру эндотелиальных клеток SVEC-4-10 в изученных (1–0,0001 мг/мл) концентрациях, в кото-рых выживаемость клеток, после инкубации с препа-ратом, составляла 90–100 % от числа клеток, которые инкубировались в чистой среде ДМЕМ. Однако про-спидин блокировал пролиферацию bFGF-активиро-ванных эндотелиальных клеток в концентрациях 1–0,05 мг/мл (ИК₅₀=0,5–0,12 мг/мл; рис. 1).

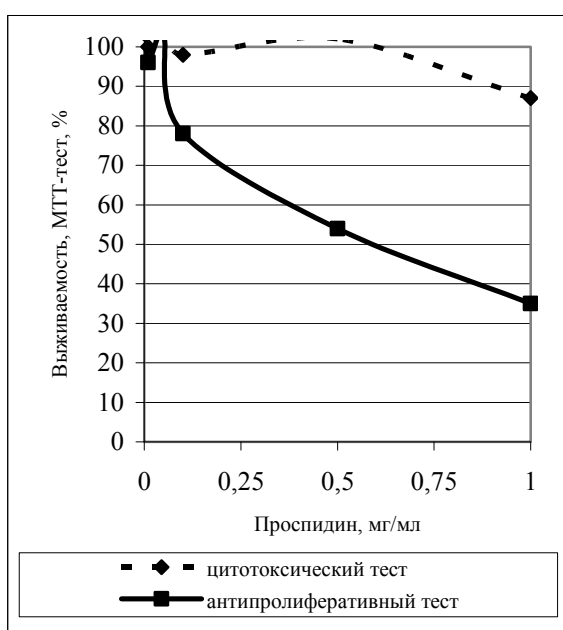


Рис. 1. Цитотоксическое и антипролиферативное действие проспи-дина на культуру эндотелиальных клеток SVEC-4-10

При тестировании клеток с помощью метода «раневого поверхности» показано, что проспи-дин блокирует миграцию эндотелиальных клеток в концентрации 1 мг/мл на 70 % (рис. 2; стр. 48). При концентрации 0,1 мг/мл и ниже ширина миграци-онной поверхности была сравнима с контрольным образцом. Данные о влиянии препарата на мигра-цию в данном тесте представлены в таблице.

Таблица

Влияние проспи-дина на миграцию культуры эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10

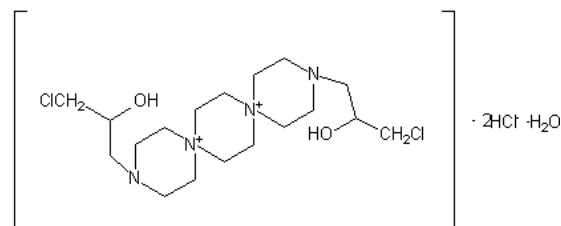
Доза препарата	Ширина миграционной поверхности, % от контроля
1 мг/мл	32±10
0,5 мг/мл	76±15
0,1 мг/мл	95±12
0,05 мг/мл	110±21

Оценено влияние нецитотоксических доз пре-парата на формирование трубочко-подобных струк-тур. Показано, что проспи-дин частично блокирует образование трубочкоподобных структур в концен-

трациях 0,5 и 0,1 мг/мл (рис. 3). Наблюдаемые тру-бочки являются короткими и прерывистыми («не-закрытыми»), т.е. не ограничены контактами с дру-гими трубочками. При концентрациях препарата 0,05 мг/мл и 0,01 мг/мл не обнаружено существен-ных отличий от контрольных опытов. Образовав-шиеся трубочки не имеют существенных отличий от контрольных образцов: трубочкоподобные структуры высоко структурированы, ярко выраже-ны, контактируют с другими трубочкоподобными структурами.

Обсуждение

Проспидин — оригинальный отечественный препарат, синтезированный во ВНИХФИ, имеет следующую структуру:



Уникальность химической структуры про-спидина (3,12-бис(3-хлор-2-гидроксипропил)-3,12-диаза-6,9-дизониадиспиро[5,2,5,2]гексадекана дихлорид) связана с наличием нескольких актив-ных центров. Доказано, что проспи-дин относится к полифункциональным молекулам. При этом раз-личные структурные элементы молекулы этого со-единения реализуют различные механизмы проти-воопухолевого эффекта препарата. В частности, две -хлор- -оксипропильных группы обладают алки-лирующим действием, а диспиротрипиперазиние-вая система, имеющая два четвертичных атома азо-та, реализует мембранотропные свойства препара-та. Кроме того, наличие двух четвертичных атомов азота в диспиротрипиперазиниевой системе являет-ся важным условием и для противоопухолевой ак-тивности проспи-дина [5; 7].

В отличие от большинства противоопухоле-вых средств, обладающих выраженным цитотоксич-ским действием, действие проспи-дина на клетку оценивается как цитостатическое (антипролифера-тивное). Доказано, что проспи-дин, обладая низкой токсичностью в широком диапазоне концентраций (от 10⁻⁹ до 10⁻² г/мл), ингибирует спонтанную пролие-рацию всех изученных типов клеток (наиболее чувствительными оказались тимоциты). Кроме того, он подавляет индуцированную пролиферацию лим-фоидных клеток, стимулированную цитокинами ли-бо митогенными лектинами (ИЛ-1 β человека, ИЛ-2, КонА, ЛПС *E. coli*), либо их сочетанием [3].

Полученные ранее результаты [1] свидетель-ствуют, что эффект проспи-дина зависит от времени введения по отношению к митогену. Наибольшее угнетение реакции бластной трансформации лей-коцитов наблюдалось при введении одновременно с ФГА или после него, что позволило авторам сде-лать предположение о преимущественном действии проспи-дина на стадии распознавания чужеродного антигена лимфоидными клетками.

Антипролиферативные эффекты проспи-дина зависят от времени введения препарата по отноше-нию к времени максимальной митотической актив-ности клетки.

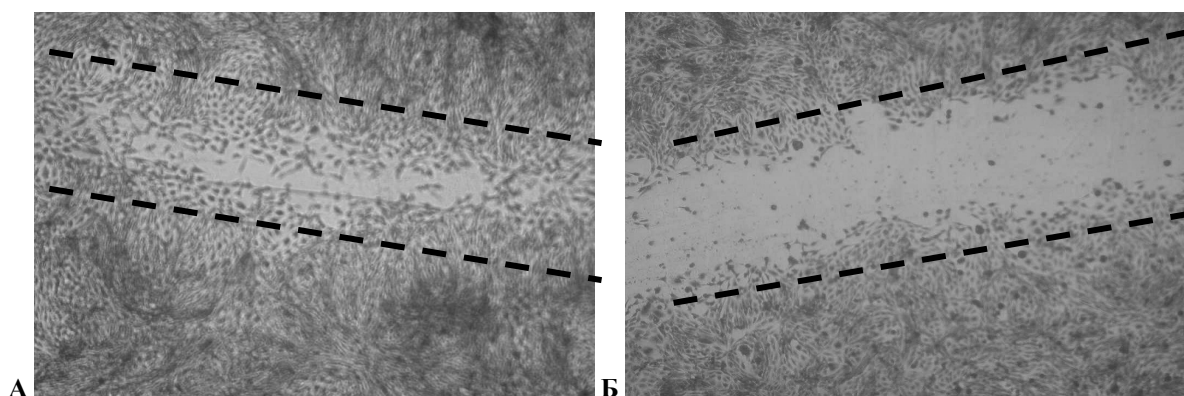


Рис. 2. Микрофотографии результатов теста на влияние на миграцию культуры эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10 (метод «раневой поверхности»):

А – контрольный образец (клетки без препарата);

Б – клетки, инкубировавшиеся с проспидином в концентрации 0,1 мг/мл.

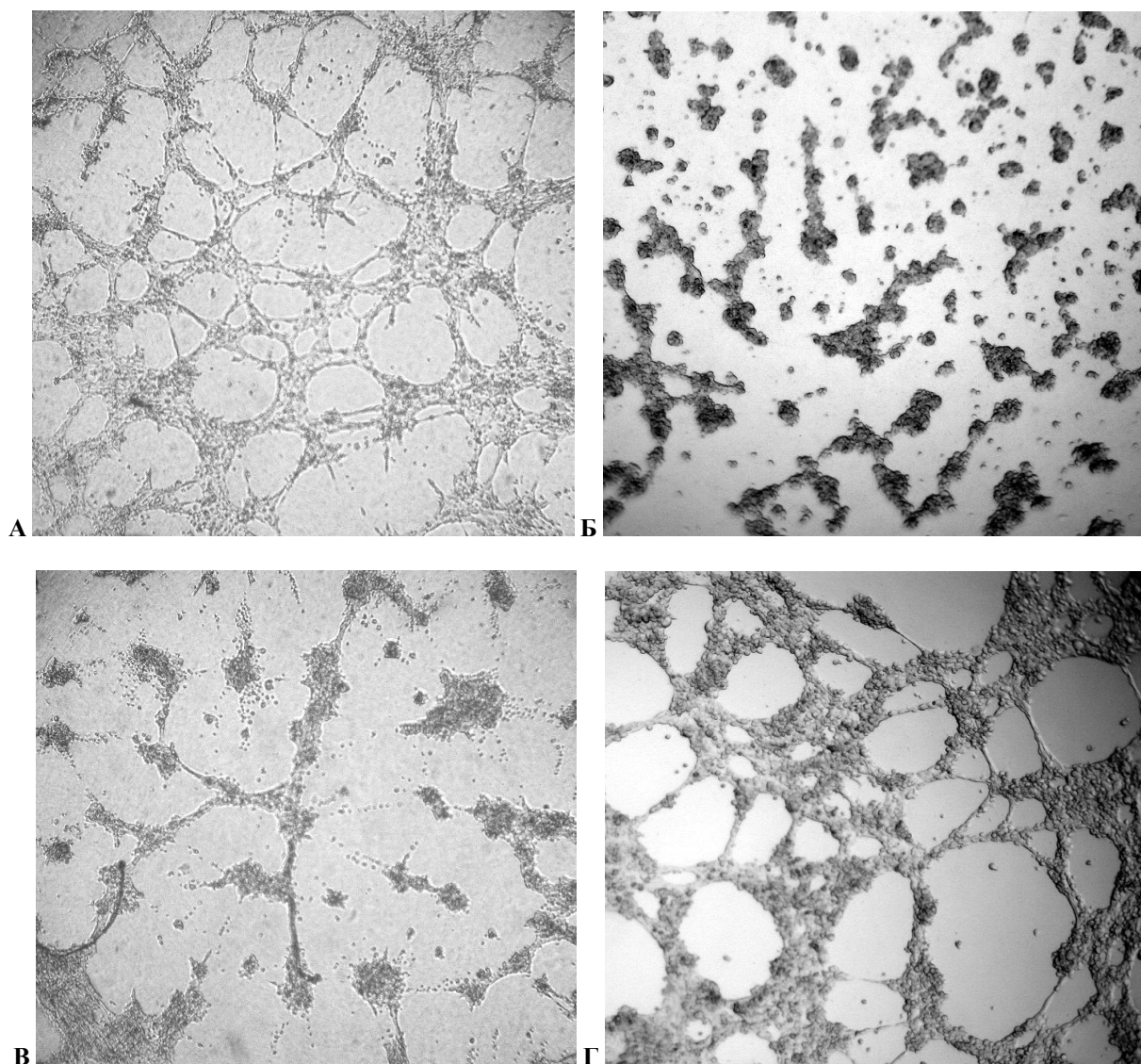


Рис. 3. Микрофотографии трубочкоподобных структур, сформированных эндотелиальными клетками:

А – контрольные клетки (без препарата);

Б – клетки, инкубировавшиеся с проспидином в концентрации 0,5 мг/мл;

В – клетки, инкубировавшиеся с проспидином в концентрации 0,1 мг/мл;

Г – клетки, инкубировавшиеся с проспидином в концентрации 0,05 мг/мл.

Введение проспирина через 8 ч после начала основной волны пролиферации не влияет на последующую митотическую активность. Анализ восходящей части кривой меченых митозов, отражающей характер перехода меченых клеток из периода G_2 в митоз, показывает, что клетки в периоде G_2 нечувствительны к проспирину и способны завершить клеточный цикл. Таким образом, введение проспирина после начала митотического цикла практически не влияет на прохождение клеток по циклу [4]. Учитывая, что проспирин не влияет на интактную клетку, можно высказать предположение, что основным объектом антипролиферативного действия препарата является клетка, вступающая в клеточный цикл.

Анализ клинических результатов доказывает, что наиболее эффективен проспирин при саркоме Капоши – злокачественной опухоли с многоочаговым характером роста, происходящей из кровеносных и лимфатических сосудов. Многолетний опыт применения проспирина в режиме монотерапии школой профессора М.Л. Гершановича (НИИ онкологии им. Петрова, Санкт-Петербург) свидетельствует, что эффективность препарата при этой патологии составляет более 85 % [2; 6]. Аналогичные результаты получены и в результате других многолетних исследований [8].

Особый интерес для обоснования использования проспирина в качестве лекарственного препарата, вызывающего подавление неопластического роста, имеют результаты многолетнего клинического изучения, проведенные в клинике офтальмологии профессором А.Д. Чупровым (Кировская медицинская академия). Серьезной проблемой при трансплантации роговицы является неоваскуляризация роговичного трансплантата после сквозной кератопластики. Причиной неоваскуляризации в этих случаях считают как иммунологический конфликт тканей донора и реципиента, так и выраженную воспалительную реакцию неиммунной природы в ответ на травматичность вмешательства в сочетании с гипоксией тканей переднего сегмента. Субконъюнктивальные инъекции препарата проспирина позволяли не только купировать воспалительную реакцию, но и полностью избежать неоваскуляризации пересаженной роговицы. В случае врастания сосудов на глазах с послеожоговыми и ишемическими изменениями визуально наблюдали запустевание и полную регрессию сосудов [9–11].

Вышеперечисленные результаты свидетельствуют не только о наличии у проспирина антипролиферативного действия, но и об избирательной способности подавлять неопластический рост. Это в свою очередь вызвало необходимость изучения молекулярных механизмов его антиангиогенных свойств.

Полученные нами результаты полностью коррелируют с данными, полученными в других исследованиях. Прежде всего, продемонстрировано отсутствие цитотоксичности препарата проспирина в широком диапазоне концентраций: от 0,0001 до 1 мг/мл, то есть фактически при увеличении дозы на четыре порядка мы не отмечаем токсического действия на культуру эндотелиальных клеток SVEC-4-10.

Ингибирование пролиферации bFGF-активированных эндотелиальных клеток было получено в концентрациях от 1,0 до 0,05 мг/мл, то есть препарат обладает шириной терапевтического действия, равной более одного порядка. Подавление пролиферации эндотелиальных и опухолевых клеток проспирин в концентрациях вне токсического диапазона является важной особенностью препара-

та. Как показано в работе лаборатории профессора А.С. Симбирцева [3], проспирин проявляет свое ингибирующее действие вне зависимости от вида изученного митогена и вида клеток. Причину этой антипролиферативной универсальности проспирина следует искать в особенностях его молекулы.

Прежде всего, это трехциклическая структура, обладающая минимальной токсичностью и максимальной противоопухолевой активностью. Далее, это наличие двух пар активных центров, каждый из которых обладает высокой связывающей способностью. И, наконец, активность проспирина в большой степени определяется оптимальным расстоянием между его реакционноспособными центрами. Профессор В.А. Чернов высказал предположение, что это расстояние совпадает с расстоянием активных центров, экспрессированных на мембране активно пролиферирующей клетки [7].

При изучении влияния препарата проспирина на миграционную способность эндотелиальных клеток показано, что блокирование миграции эндотелиальных клеток на 70 % отмечено при концентрации 1 мг/мл. При более низких концентрациях ингибирующее воздействие было сопоставимо с данными контроля.

Показано, что проспирин частично блокирует образование трубчоподобных структур в концентрациях не ниже 0,1 мг/мл.

Таким образом, действие проспирина непосредственно на процесс формирования микрососудов проявляется при более высоких дозировках, чем в случае блокирования пролиферации.

Однако в целом организме все эти процессы протекают одновременно и взаимосвязано. Поэтому результаты клинического использования проспирина демонстрируют высокую эффективность прежде всего при патологических процессах, сопровождающихся не только высокой пролиферативной активностью, но в первую очередь пролиферацией эндотелиальных клеток, а значит и высоким уровнем неопластического роста [2].

В научном исследовании, посвященном, в том числе, изучению влияния проспирина на состояние цитокиновой системы, высказано предположение, что проспирин оказывает ингибирующее действие на продукцию эндогенных цитокинов [3]. Вероятно, что одним из возможных механизмов антиангиогенной активности проспирина является его способность подавлять синтез и/или освобождение стимуляторов ангиогенеза (VEGF, bFGF, тимидин фосфорилаза, ангиогенин). Это предположение нуждается в дальнейшем исследовании и диктует необходимость проведения следующей серии уточняющих экспериментов.

Заключение

Накопленный клинический опыт, свидетельствующий о наличии у проспирина выраженного антиангиогенного действия, стимулировал начало исследований, выясняющих интимные механизмы, лежащие в основе способности подавлять не только развитие сосудистых опухолей, но и развитие метастазов. Настоящее исследование позволило установить, что в экспериментах *in vitro* проспирин ингибирует основные этапы опухолевого ангиогенеза: пролиферацию, миграцию и формирование капиллярноподобных структур в концентрациях до 0,1 мг/мл.

Таким образом, одним из механизмов действия отечественного препарата проспирин является ингибирование ангиогенеза.

Литература

1. Богомолова Н.С., Сускова В.С., Муховатова Л.М. Влияние проспидина и спиробромина на бласттрансформацию лимфоцитов // Противоопухолевые препараты. – Сб. научн. трудов ВНИХФИ. – М., 1984. – С. 138–41.
2. Гершанович М.Л., Разнатовский И.М., Ястребов В.В. Обоснование клинического изучения проспидина при саркоме Капоши и кожных лимфомах, ассоциированных со СПИДом // Материалы 3-й Международной конференции «СПИД, рак и родственные проблемы». – 1995. – С. 58.
3. Петров А.В., Пигарева Н.В., Емельянов С.А., Симбирцев А.С. Влияние проспидина на синтез цитокинов и функциональную активность лимфоцитов в культуре // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т. 6, № 1. – С. 54–9.
4. Соколова А.С., Фактор В.М., Урываева И.В. Сравнение механизмов антитмитотического действия проспидина, спиробромина, фопурина и фотрина на модели регенирирующей печени мыши // Противоопухолевые препараты. – Сб. научн. трудов ВНИХФИ. – М., 1984. – С. 132–5.
5. Соколова И.С., Рябоконь Н.А. и др. Влияние проспидина на синтез ДНК в клетках меланомы В16, костного мозга и эпителия тонкого кишечника мышей // Экспериментальная онкология. – 1980. – № 5. – С. 60–3.
6. Стуков А.Н., Гершанович М.Л., Бланк М.А. и др. Лекарственная терапия опухолей. Под ред. М.Л. Гершановича и В.А. Филова. – СПб: НИКА, 2006. – С. 528.
7. Чернов В.А., Геодакян С.В. О роли плазматической мембраны в механизме противоопухолевого действия проспидина. // Химико-фармацевтический журнал. – 1976. – № 12. – С. 7–13.
8. Чистякова И. А., Самсонов В.А. Тридцать лет применения проспидина в дерматологии // Вестник дерматологии и венерологии. – 1999. – № 3. – С. 41–2.
9. Чупров А. Д. Подавление ангиогенеза как одно из проявлений иммунодепрессивного действия проспидина // Научно-практическая ревматология. – 2000. – № 3. – С. 133.
10. Чупров А.Д., Плотникова Ю.А. Результаты применения проспидина после сквозной кератопластики у больных с васкуляризированными посттравматическими рубцами роговицы // Офтальмология на рубеже веков. – Юбилейная научная конференция посвященная 80-летию проф. Волкова В.В. – СПб, 2001. – С. 391–2.
11. Чупров А.Д., Плотникова Ю.А. Опыт лечения и профилактики болезни трансплантата после сквозной кератопластики // Тези доповідей X з'їзд офтальмологів України. – Одесса. – 2002. – С. 60–1.
12. Bevacizumab. Anti-VEGF monoclonal antibody, avastin, rhumab-VEGF // Drugs R D. – 2002. – Vol. 3(1). – P. 28–30.
13. Browder T., Butterfield C.E., Kraling B.M. et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer // Cancer Res. – 2000. – Vol. 60. – P. 1878–86.
14. Chistofalli M., Charnsangavej C., Hortobagyi G.N. Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches // Nature Reviews. – 2002. – Vol. 1. – P. 415–26.
15. Ciardiello F. et al. Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by ZD1839 (Iressa), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor // Clin. Cancer Res. – 2001. – Vol. 7. – P. 1459–65.
16. Ellis L.M. Tumor Angiogenesis // Horizons in Cancer Res. – 2002. – Vol. 3(1). – P. 4–22.
17. Emmenegger U., Man S., Shaked Y. et al. A comparative analysis of low-dose metronomic cyclophosphamide reveals absent or low-grade toxicity on tissues highly sensitive to the toxic effects of maximum tolerated dose regimens // Cancer Res. – 2004. – Vol. 64. – P. 3994–4000.
18. Hanahan D., Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis // Cell. – 1996. – Vol. 86. – P. 353–64.
19. Izumi Y., Xu L., di Tomaso E. et al. Tumor biology: Herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail // Nature. – 2002. – Vol. 416. – P. 279–80.
20. Kerbel R., Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. // Nature Reviews. – 2002. – Vol. 2. – P. 727–39.
21. Laquente B., Vinalis F., Germa J.R. Metronomic chemotherapy: an antiangiogenic scheduling // Clin. Transl. Oncol. – 2007. – Vol. 9(2). – P. 93–8.
22. Uzzan B., Nicolas P., Cucherat M., Perret G-Y. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis // Cancer Res. – 2004. – Vol. 64. – P. 2941–55.
23. Yang J.C., Haworth L., Steinberg S.M. et al. A randomized double-blind placebo controlled trial of bevacizumab anti-VEGF antibody demonstrating a prolongation time to progression in patients with metastatic renal cancer // Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. – 2002. – Vol. 21. – P. 15.

УДК 618.19-006.6-092.9:615.277.3.015.21:616-08-59

*М.С. Калишьян¹, Л.А. Седикова¹, Н.Т. Райхлин¹, Е.М. Трещалина¹, Е.В. Лукашева²***ЭФФЕКТИВНОСТЬ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ПО СХЕМЕ АДРИАМИЦИН+ЦИКЛОФOSФАМИД В СОЧЕТАНИИ С БИНАРНОЙ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМОЙ ТЕРАФТАЛ + АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА НА МОДЕЛИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЫШЕЙ СА-755**¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва²Российский университет дружбы народов, Москва**Контактная информация:**

Калишьян Михаил Сергеевич, ведущий ветеринарный врач лаборатории комбинированной терапии опухолей НИИ ЭДнТО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(499)517-32-35**e-mail:** magicvet@mail.ru

Статья поступила: 16.03.2009 г., принята к печати: 23.09.2009 г.

Резюме

В опытах на мышинной развившейся солидной аденокарциноме молочной железы Ca-755 (PЭ⁺) изучена возможность повышения эффективности неоадъювантной химиотерапии по схеме адриамицин+циклофосфамид (*adriamycin+cyclophosphamide*, AC) с использованием каталитической системы терафтал + аскорбиновая кислота (ТФ+АК). Сравнительная оценка эффективности трехкомпонентной схемы AC+ТФ+АК проведена по стандартным критериям под контролем переносимости и лечебного патоморфоза в опухоли. Наше исследование показало, что проведение 2 циклов неоадъювантной химиотерапии AC+ТФ+АК (химиотерапия – первая) позволяет получить достоверно более высокий циторедуктивный эффект с выраженным лечебным патоморфозом.

Ключевые слова: модель РМЖ Ca-755, AC+ТФ+АК, неоадъювантная химиотерапия, эффективность, переносимость, лечебный патоморфоз.

*M.S. Kalishyan¹, L.A. Sedakova¹, H.T. Raichlin¹, H.M. Treshalina¹, E.V. Lukasheva²***EFFICACY OF ADRIAMYCIN+CYCLIPHOSPHAMIDE (AC) REGIME OF NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY IN COMBINATION WITH BICATALYTIC SYSTEM TERAPHTAL + ASCORBIC ACID BY THE TREATMENT ON MURINE BREAST CANCER CA-755**¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow²Russian University of Peoples Friendship, Moscow**Abstract**

Potential increasing efficacy of neoadjuvant therapy with AC (*adriamycin+cyclophosphamide*) plus binary catalytic system (BCS) Teraphtal+Ascorbic acid (TF+AA) against solid murine mammary adenocarcinoma Ca-755 (ER⁺) was evaluated. Compared value of triple regime with AC+BCS effectivity was observed using standard criteria, well tolerance control and therapeutic pathomorphosis (TP) in tumor. As a result of this investigations the significant efficacy and TP for 2 cycles with triple regime AC+BCS was demonstrated.

Key words: mammary adenocarcinoma Ca-755, *adriamycin+cyclophosphamide*, *teraphtal+ascorbic acid*, neoadjuvant regime, efficacy, tolerance, therapeutic pathomorphosis.

Введение

Неоадъювантная химиотерапия РМЖ проводится для достижения операбельности местно-распространенных опухолей больших размеров, а также для снижения риска отдаленного метастазирования. Об эффективности терапии судят по уменьшению (циторедукции) образования и наличию значимого лечебного патоморфоза ткани опухоли. Схема AC является одним из стандартов лечения РМЖ и применяется в виде двух циклов лечения до операции. Ожидаемое побочное действие AC – кардиотоксичность, связанная с адриамицином, и гематотоксичность, характерная для циклофосфамида. Эскалация дозы адриамицина невозможна из-за его лимитирующей кардиотоксичности, поэтому модификация AC возможна только путем замены компонентов на препараты с иным профилем токсичности [10; 11–13; 18].

БКС ТФ+АК, компоненты которой в отличие от таковых AC не имеют лимитирующей токсичности [1; 3; 7; 8; 14; 16], при экспериментальном изучении на модели аденокарциномы молочной железы мышей Ca-755 показали значимую противоопухолевую активность как в монорежиме, так и для повышения эффективности А или С [9].

При клиническом изучении БКС у пациенток РМЖ с исчерпанными возможностями специфической терапии наблюдались длительные периоды стабилизации процесса [8]. Перечисленные сведения послужили основанием для изучения возможности включения БКС в неоадъювантную схему ПХТ AC.

Цель исследования – повышение эффективности предоперационного лечения РМЖ за счет включения каталитической системы БКС в стандартную схему AC.

Задачи исследования

1. Оптимизация дозового режима препаратов под контролем переносимости.
2. Выбор последовательности применения комбинантов.
3. Оценка эффективности курсового лечения.

Материалы и методы**Животные**

В опытах использовали мышей-самок C57Bl6 массой тела не менее 18 г из питомника РАМН «Столбовая». Животных содержали в виварии отдела лабораторных животных РОНЦ с естественным освещением на брикетированном корме и постоянном доступе к воде. Перед лечением мышей распределяли на группы ($n = 7-10$). В качестве групп сравнения использованы мыши, получавшие адекватную монотерапию или комбинированную химиотерапию АС. Одну группу оставляли без специфического лечения и считали контрольной ($n = 8-10$).

Модель опухоли

Выбор модели для изучения основан на известных данных о том, что чувствительность РМЖ к неоадьювантной терапии в клинике связана с наличием рецепторов гормонов [2]. Нами использована развившаяся солидная слабо гормонозависимая аденокарцинома молочной железы Ca-755, которую трансплантировали мышам подкожно взвесью клеток в питательной среде 199 по стандартной методике [15; 17].

Подтверждение гормонального статуса модели

До лечения в опухоли верифицировано содержание рецепторов эстрогенных гормонов по стандартной методике. Исследование выполнено проф. Е.С. Герштейн. Получение одинаковых результатов обеспечено взятием материала в утренние часы с учетом циркадных ритмов РЭ [4-6].

Препараты

Адриамицин (Адр, адриабластин или Докс, доксорубин, Эбеве, Польша) и циклофосфамид (ЦФ, циклофосфан, Лэнс, РФ) вводили мышам в 0,9%-ном растворе натрия хлорида внутривенно (в/в) однократно в диапазоне эффективных переносимых доз.

ТФ (окта-4,5-карбокситаллоцианина кобальта натриевая соль, ФГУП «ГНЦ НИОПИК») и АК (официальный 5%-ный раствор аскорбиновой кислоты) вводили однократно внутривенно (в/в) последовательно с интервалом 1 ч в эффективных переносимых дозах. В группах комбинированного лечения препараты вводили в разной последовательности в ранее подобранных дозах. При проведении одного цикла лечения средний объем опухолевого узла составлял $0,5-0,7 \text{ см}^3$. При проведении 2 циклов лечения объем опухоли к первому циклу составлял $0,2-0,3 \text{ см}^3$. Интервал между циклами – 6 дней. Такой график лечения выполнен в связи с высоким темпом роста опухоли у мышей.

Оценка противоопухолевого эффекта

Об эффективности лечения судили по скорости роста опухоли и регрессии опухолевых узлов в сравниваемых группах. Скорость роста определяли по времени удвоения объема опухоли «т», для чего в разные сроки опухоли измеряли в 3 перпендику-

лярных диаметрах и рассчитывали средний объем $V_{\text{ср}} (\text{мм}^3) = a \times b \times c$. Затем вычисляли V_t/V_0 и графическим способом определяли «т» в сравниваемых группах. Регрессию опухолевого узла определяли по коэффициенту эффективности (К), который вычисляли как соотношение «т» в исследуемой группе по отношению к группе сравнения.

Оценка лечебного патоморфоза

Верификацию циторедуктивного действия проводили по степени лечебного патоморфоза, для чего у части мышей ($n = 3-5$) опухоли удаляли в сроки измерения объема и подвергали гистологическому исследованию при стандартной окраске срезов гематоксилин-эозином. Срезы просматривали в микроскопе «Поливар», Австрия.

Завершение опыта

Наблюдение продолжали до 2-кратного или 5-кратного увеличения опухолей в контрольной группе, после чего мышей умерщвляли передозировкой эфирного наркоза.

Оценка переносимости

О переносимости лечения судили по состоянию и поведению животных, а также по ожидаемой гибели от токсичности. Павших или умерщвленных в конце опыта мышей подвергали аутопсии для визуального определения патологических изменений внутренних органов.

Статистическая обработка

Полученные данные подвергали статистической обработке по методу Фишера-Стьюдента в модификации Р.Б. Стрелкова, рассчитывая доверительные интервалы средних сравниваемых величин. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение**Число эстрогенных рецепторов на клетках Ca-755**

Как видно из табл. 1, в достаточно большой группе наблюдений ($n=22$) число РЭ в Ca-755 в утренние часы (минимальная гормональная активность) существенно колеблется и составляет от 10,0 до максимального значения 16,5 фмоль/мг, среднее значение показателя $10,4 \pm 1,3$ фмоль/мг. Уровень РЭ соответствует описанному в литературе [4]. Полученные данные подтверждают наличие гормональной чувствительности Ca755.

Эффективность неоадьювантной ХТ по схеме АС (1 цикл)

Поскольку ранее эффективность АС в неоадьювантном режиме на развившейся Ca-755 не изучалась, сначала были определены эффективные и переносимые дозы АС для сочетания с БКС.

Лечение начато на 10-е сутки при стартовом объеме опухоли $V_{\text{ср}} = 622-685 \text{ мм}^3$ по схеме: Докс в дозах 4 или 8 мг/кг, ЦФ – 100 или 200 мг/кг одновременно последовательно. Выбранный для комбинированной химиотерапии дозовый диапазон АС и изменения V опухоли представлены в табл. 2; где:

$$V_{\text{отн}} = \frac{V_t}{V_0}; K = \frac{\tau_1}{\tau_2} \quad (1 - \text{опыт}; 2 - \text{контроль})$$

Видно, что эффективность и переносимость схемы АС различна и прямо зависит от величины примененных доз препаратов.

При использовании полных доз комбинантов результатом лечения является регрессия опухолевых узлов на 30–50 % и последующая длительная задержка роста, при которой опухоли растут почти в 4 раза медленнее контроля и не достигают 2-кратного увеличения размера в течение 2 недель ($K=3,7$). В случае использования половинных доз комбинантов регрессия опухоли составляет 20 %, но длительность задержки роста опухоли остается высокой, о чем свидетельствует 3-кратное пролонгирование времени удвоения опухоли, $K=3,1$. Переносимость лечения по схеме АС в половинных дозах удовлетворительная, все мыши перенесли лечение без изменения поведения и состояния, выраженных побочных эффектов или гибели от токсичности не наблюдали. Схема АС в полных дозах оказалась высокотоксичной для мышей с Са-755: 2 из 7 пали на 8-е сутки после лечения. Таким образом, для комбинации с ТФ+АК выбраны эффективные дозы АС 4,0+100 мг/кг.

Эффективность неоадьювантной ХТ по схеме АС+БКС (1 цикл)

Мышей с развившейся Са755 делили на следующие группы:

- Основные группы:
 - ТФ в/в 30 мг/кг+1 ч+АК в/в 66 мг/кг+1 ч+Докс 5 мг+ЦФ 100 мг/кг одновременно последовательно.
 - Докс 5 мг+ЦФ 100 мг/кг одновременно последовательно+1 ч+ТФ в/в 30 мг/кг+1 ч+АК в/в 66 мг/кг.
- Контроль эффективности Докс 5 мг в/б $\times 1$.
- Контроль эффективности ЦФ 100 мг/кг в/б $\times 1$.
- Контроль эффективности ТФ в/в+1 ч+АК в/в 30+66 мг/кг.
- Контроль эффективности ЦФ 100 мг/кг+Докс 5 мг/кг одновременно последовательно.
- Контроль роста опухоли. В/в физ. раствор.

Результаты лечения с введением сначала каталитической системы ТФ+АК, полученные при лечении опухолей размером $V_{ср}=765\ 288\ \text{мм}^3$, представлены в табл. 3.

Выявлено, что эффективны на развившейся Са-755 были комбинация АС и одна каталитическая система, но уровень эффекта БКС был вдвое ниже такового при применении стандартной схемы химиотерапии. Сочетание БКС с АС при введении каталитической системы первой не привело к увеличению эффекта лечения. Полученный результат подтверждает выявленную ранее *in vitro* способность ТФ снижать чувствительность клеток к Докс [Т.А. Сидорова, неопубликованные данные].

Следующий опыт проведен с изменением последовательности введения комбинантов. Мышей с Са-755 для опыта готовили следующим образом. На 10-е сутки из 60 мышей, которым прививали опухоль, отобрали 40 с опухолями, достигшими среднего объема $V_{ср}\ 700\ \text{мм}^3$, после чего разделили на группы по 10 в каждой.

Основная группа: животные получали тройное сочетание АС+БКС; сначала одновременно последовательно вводили Докс+ЦФ, затем через 1 ч вводили ТФ и еще через 1 ч – АК. Группы контроля эффективности лечения: мыши получали каждый из комбинантов Докс+ЦФ или БКС. В одной группе (контроль роста опухоли) мышей получала в/в однократно физиологический раствор хлористого натрия.

Всего в опыте было 4 группы мышей со стартовым объемом опухолей $V_{ср}=765\ 288\ \text{мм}^3$. Результаты лечения представлены в табл. 4 и 5.

Видно, что в основной группе мышей, получивших последовательно химиотерапию АС, а затем каталитическую систему, на 4–8 сутки после лечения достигнут существенный достоверный противоопухолевый эффект. $\text{TPO}_{\text{max}} = 80\ %$ ($p\ 0,05$). Переносимость терапии при этом была удовлетворительной, гибели от токсичности не наблюдали. Контроль эффективности комбинантов показал более низкие результаты, максимальное значение которых не имело достоверных отличий от контроля: при применении АС или БКС в адекватных дозах $\text{TPO}_{\text{max}} = 63 - 66\ %$ ($p\ 0,05$).

Оценка эффективности тройной комбинации по изменению скорости роста опухоли проведена в сравнении с контролем без лечения, где удвоение стартового объема опухоли ($V_0=766\pm 288\ \text{мм}^3$) произошло к 11 суткам ($\tau=11$). В основной группе после лечения АС+БКС удвоение стартового объема опухоли ($V_0=780\pm 232\ \text{мм}^3$) наблюдали к 16 суткам ($\tau=16$), $K=1,45$. В группе контроля эффективности комбинантов АС или БКС при стартовых объемах опухолей $V_0=788\pm 266\ \text{мм}^3$ и $780\pm 255\ \text{мм}^3$ соответственно удвоение размеров опухоли наступило к 14 суткам ($\tau=14$), что мало отличается от контроля, $K=1,27$.

Полученные результаты позволили считать, что эффективность 1 цикла неоадьювантной комбинированной химиотерапии АС+БКС развившейся Са-755 зависит от последовательности введения комбинантов. При проведении лечения необходимо, чтобы каталитическая система была введена последней, т.е. после завершения стандартной химиотерапии. При этом достигается достоверное усиление противоопухолевого эффекта при удовлетворительной переносимости лечения. Указанная последовательность введения препаратов была использована при проведении двух циклов лечения. Проведение длительного лечения АС+БКС на этой модели было возможно только при более раннем начале первого цикла.

Эффективность неоадьювантной ХТ Са-755 по схеме АС+ТФ+АК (2 цикла)

Проведено 2 цикла лечения по схеме АС+ТФ+АК с интервалом 6 дней. Последовательность введения: Докс, через 15 мин ЦФ, затем через 30 мин ТФ, через 1 ч АК.

В опыте были следующие группы:

- Основная группа:

Докс 3 мг/кг в/б + ЦФ 200 мг/кг в/б + БКС (30+66 мг/кг) в/в.
- Контроль эффективности химиотерапии:

Докс 3 мг/кг в/б + ЦФ 50 мг/кг в/б.
- БКС (30+66 мг/кг) в/в.
- Контроль роста опухоли, в/в физ. раствор.

Лечение начинали на 10-е сутки после перевивки опухоли при достижении $V_{ср}=288-314\ \text{мм}^3$. Оценку противоопухолевого эффекта проводили на 4-е сутки после первого и второго циклов лечения и на 9-е сутки после второго цикла лечения. Верификация лечебного патоморфоза проведена на 4-е сутки после 2 цикла, для чего у 3 мышей из каждой группы опухоли удаляли, фиксировали в нейтральном формалине и подвергали патоморфологическому исследованию.

В результате установлено, что в основной группе животных, получивших лечение АС+БКС, уже сразу после окончания 1 цикла лечения достигнуто достоверное ингибирование роста опухоли: $\text{TPO}=66\ %$ ($p\ 0,05$), а после 2 цикла время удвоения опухоли было пролонгировано в 3,3 раза: $\tau=6,5$, $K=3,3$ (табл. 6).

Контроль эффективности комбинантов АС и ТФ+АК показал, что несмотря на относительно небольшие опухоли и интенсификацию лечения (2 цикла) эффективность по показателю ТРО была невысокой и отмечалась только после 2 цикла лечения, ТРО_{max} = 68 и 55 % соответственно. Скорость роста опухоли в этих группах отставала от контроля не более чем в 2 раза, о чем свидетельствуют, $\leq 13,0$ дней, $K \leq 2,5$.

Переносимость всех видов лечения была удовлетворительной, каких-либо побочных эффектов или гибели от токсичности не наблюдали.

Оценка лечебного патоморфоза

Контроль роста опухоли показан на рис. 1 (А и Б). Опухоль состоит из различной величины полиморфных клеток. Ядра гиперхромные, округло-овальной формы, крупные. Опухолевые клетки образуют солидно-железистоподобного характера дольки неправильной или округлой формы. Местами в дольках или между ними видны кровеносные сосуды. Площадь некрозов у разных мышей контрольной группы колеблется.

У одной мыши она составляет 5 – 10 %, у другой 20 – 30 %, у третьей – 30 – 40 % (в среднем 10 – 40 %) площади среза. Митозы составляют 1 – 3 %, апоптоз – 0,3 – 0,5 %. Строма в опухоли развита слабо. Иногда в опухоли встречается выраженная лимфоидная инфильтрация.

АС+БКС рис. 2 (А–В). В опухоли преобладают дольки с железистоподобными структурами. Опухолевые клетки полиморфные с гиперхромными ядрами. Характерной особенностью опухолей этой группы является наличие в них массивных, иногда тотальных некрозов, занимающих 90–95 % площади среза. Опухолевая ткань сохранилась в отдельных участках по периферии новообразования в виде мелких очагов. В этих местах на границе с некрозом видны клетки с признаками апоптоза, их количество в таких участках иногда составляет до 12 %. Митозы составляют 1–1,5 %.

АС (рис. 3). В опухоли у 2 мышей некрозы составляют до 80 % площади среза, у 1 мыши – в пределах 60 %. Митозы до 2 %, число клеток с признаками апоптоза в пределах 5–7 % располагаются главным образом на границе с некрозами. Сохранившиеся участки опухоли имеют дольчатое строение, клетки полиморфные с гиперхромными ядрами.

БКС (рис. 4). Некрозы в опухоли не превышают 50 % площади среза. Митозы у разных мышей от 0,5 до 2 %. Число клеток с признаками апоптоза составляет 2 – 5 % в участках на границе с некрозами. Местами опухоль состоит из округлых или неправильной формы долек, местами с железистоподобными структурами. Опухолевые клетки полиморфные, ядра гиперхромные.

Литература

1. Андропова Н.В., Трещалин И.Д., Трещалина Е.М., Герасимова Г.К. Противоопухолевое и склерозирующее действие каталитической системы терафтал + аскорбиновая кислота // Российский биотерапевтический журнал. – Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты». – 2003 г. – Т. 2, № 1. – С. 13.
2. Борисов В.И., Сарибекян Э.Л. Неоадьювантная химиотерапия рака молочной железы. – В кн.: «Новое в терапии рака молочной железы» под ред. проф. Н.И. Переводчиковой, 1998. – С. 43–7.
3. Калишнян М.С., Седакова Л.А., Андропова Н.В. и др. Возмозможность проведения неоадьювантной полихимиотерапии рака молочной железы у собак с использованием каталитической системы терафтал + аскорбиновая кислота // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, №1. – С. 33.
4. Кубасова И.Ю. Рациональные подходы к сочетанию химиотерапии со стероидными гормонами и оксикобаламином при лечении злокачественных опухолей: Авторефер. дис... канд. мед. наук – М., 1994. – 24 с.
5. Кубасова И.Ю., Софьина З.П. Гормональные вещества как стимуляторы или ингибиторы роста опухолей в комбинации с цитостатиками // Вестник ОНЦ РАМН. – Приложение к выпуску №1. – 1993. – С. 26–30.

Данные патоморфологического исследования свидетельствуют о том, что при эффективной неоадьювантной химиотерапии АС+БКС в опухоли Са-755 значимо, до 90–95 % площади среза, увеличивается зона некроза и, в отдельных участках, возрастает число клеток с признаками апоптоза до 12 %, что соответствует лечебному патоморфозу III–IV степени.

Одна химиотерапия АС вызывает гибель опухолевых клеток преимущественно путем некроза, доля которого достигает 80 %, доля клеток с признаками апоптоза не превышает 5 %.

Терапия БКС, в отличие от АС, вызывает гибель клеток преимущественно путем апоптоза, доля которого достигает 10–12 %, тогда как площадь некроза не превышает 50 %.

Полученные результаты показали, что при сочетании АС и БКС достигается достоверное существенное (до 80 %) усиление ингибирования опухолевого узла развившейся аденокарциномы молочной железы Са-755 с длительной задержкой скорости роста вследствие суммации противоопухолевых эффектов комбинантов на тканевом и клеточном уровне. Это приводит к некротической и апоптотической гибели опухолевых клеток. Опыты показали, что использование БКС в сочетании со стандартной схемой химиотерапии АС в полных дозах дает возможность провести 2 цикла неоадьювантного лечения с интервалом 6 дней при удовлетворительной переносимости. Причиной этого является отсутствие перекрестной токсичности с противоопухолевыми цитостатиками схемы АС.

Заключение

Проведенное исследование показало, что при чувствительной к химиотерапии РЭ⁺ аденокарциноме молочной железы мышей Са-755 проведение двух циклов неоадьювантной химиотерапии модифицированной схемой АС+БКС (ТФ+АК) с последовательным введением комбинантов (химиотерапия – первая, каталитическая пара – последняя) дает возможность получить достоверный циторедуктивный эффект с выраженным лечебным патоморфозом. БКС в комбинации с циклофосфаном и доксорубицином повышая эффективность не ухудшает переносимость лечения, что открывает перспективу улучшения результатов не только неоадьювантной химиотерапии, но и дает возможность прогнозировать эффективность БКС при включении в схемы адьювантного лечения. Доказанное в эксперименте отсутствие лекарственной резистентности к БКС повышает значимость этой системы как потенциального комбинанта для химиотерапии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Москвы.

Таблица 1

Число рецепторов эстрогенных гормонов на клетках Ca-755/ мыши BDF1

Индивидуальные значения числа РЭ фмоль/мг белка											M±d* (n=22)
10,6	10	6,3	7,9	13,3	5,7	9,1	14,9	14,4	5,9	15,2	10,4
5,6	15,0	13,5	11,1	5,1	11,9	10,0	14,0	4,0	16,5	10	[9,1±11,7]

*Среднее значение с ДИ

Таблица 2

Эффективность схемы АС на развившейся опухоли Ca-755

Группа	Vотн/сутки после воздействия				Регрессия, %	τ*	К**
	0	3	8	13			
Контроль (физ.раствор)	1,0	5,3	15,2	21,5	–	3,5	–
Адр 4 мг/кг + ЦФ 100 мг/кг	1,0	0,8	1,0	4,8	20	11,0	3,1
Адр 8 мг/кг + ЦФ 200 мг/кг	1,0	0,45	0,77	1,54***	55-23	13	3,7

*время удвоения размеров опухоли, сутки;

**коэффициент усиления противоопухолевого эффекта;

***2 из 7 мышей пали от токсичности на 8-е сутки после лечения.

Таблица 3

Эффективность модифицированной схемы БКС+АС (1 цикл)

Группа	Vотн/сутки после воздействия	
	0	4
Контроль роста опухоли (физ. раствор)	1,0	7,1
БКС (30+66 мг/кг)	1,0	1,6
Адр 4 мг/кг+ЦФ 100 мг/кг	1,0	0,5
БКС (30+66 мг/кг) + Адр 4 мг/кг + ЦФ 100 мг/кг	1,0	0,5

Таблица 4

Эффективность модифицированной схемы АС+БКС (1 цикл)

Группа*	Доза, мг/кг	Vcp мм ³ /сутки после перевивки			TPO%/сутки после лечения	
		10	14	18	4	8
Контроль	–	765±288	4415±2035	7326±3484	–	–
Адр+ЦФ	3,0+50,0	788±266	1500±976	2616±2959	66	64
БКС	30,0+66,0	780±255	1613±1101	4374±4768	63	40
Адр+ ЦФ+БКС	3,0+50,0 30,0+66,0	780±232	885±433	2686±1668	80 p 005	63

*Составлены из 10 мышей

Таблица 5

Скорость роста опухоли: модифицированная схема АС+БКС (1 цикл)

Группа	Vотн/сутки после воздействия			τ*	К**
	10	14	18		
Контроль (физ.раствор)	1,0	5,6	9,6	11	–
Адр 3 мг/кг + ЦФ 50 мг/кг	1,0	1,9	3,3	14	1,27
БКС (30+66) мг/кг	1,0	2,0	5,6	14	1,27
Адр 3 мг/кг + ЦФ 50 мг/кг + БКС (30+66) мг/кг	1,0	1,1	3,4	16	1,45

*Время удвоения размеров опухоли, дни;

**коэффициент усиления противоопухолевого эффекта.

Таблица 6

Эффективность модифицированной схемы АС+БКС (2 цикла через 6 дней)

Препарат, доза (мг/кг), эффективность	Vотн/сутки после воздействия				Показатели эффективности			
	Исходно	После цикла лечения			1		2	
		1	2		τ ₁ *	К**	τ ₂	К
		4	4	9				
Физ. раствор	1,0	3,0	9,4	16,3	2,0	–	7,0	–
Докс 3,0 + ЦФ 50,0	1,0	2,4	4,6	10,2	3,0	1,5	11,4	1,6
TPO, %	–	26	55	43				
БКС (30,0+66,0)	1,0	1,4	4,5	16,2	5,0	2,5	11,2	1,6
TPO, %	–	56	57	8				
Докс 3,0 + ЦФ 50,0 + БКС (30,0+66,0)	1,0	1,1	3,2	7,9	6,5	3,3	13,0	1,9
TPO, %	–	66***	68	55				

*Время удвоения размеров опухоли (дни), τ – до 2-кратного объема, τ₅ – до 5-кратного объема;

** коэффициент усиления противоопухолевого эффекта;

***Различия с группой контроля достоверно, p 0,05.

Литература (окончание)

6. Кубасова И.Ю., Софьина З.П., Бассалык Л.С. Зависимость гормонального статуса мышей от вида и скорости роста опухоли // Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей. – Черноголовка. – 1987. – №1. – С. 78–81.
7. Кульбачевская Н.Ю., Манзюк Л.В., Михайлова Л.М. Клинико-экспериментальное изучение токсичности противоопухолевой каталитической системы «терафтал + аскорбиновая кислота» («ТФ+АК») // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 70.
8. Манзюк Л.В., Бредер В.В., Гершанович М.Л. и др. Результаты I–II фазы клинических испытаний каталитической системы «Терафтал + аскорбиновая кислота» // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 105–7.
9. Переводчикова Н.И. Новое в терапии рака молочной железы. – М.: «Медицина», 1998. – С. 91.
10. Патент №2,200,220 от 30.05.2006 г. Канада. Средство для подавления опухолевого роста / Сыркин А.Б., Герасимова Г.К., Жукова О.С., Трещалина Е.М. и др.
11. Рак молочной железы / В.П. Летагин. Первичные опухоли молочной железы. Практическое руководство по лечению. – М.: «Миклош», 2004. – 332 с.
12. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний / под ред. Н.И. Переводчиковой. – М.: «Практическая медицина», 2005. – С. 267–71.
13. Семглазов В.Ф., Арзуманов А.С., Божок А.А. и др. Новый взгляд на неоадьювантную химиотерапию рака молочной железы // Современная онкология. – 2003. – Т. 5, № 3. – С. 102–7.
14. Сыркин А.Б., Жукова О.С., Кикоть Б.С. и др. Терафтал – новый препарат для бинарной каталитической терапии злокачественных опухолей // Российский химический журнал. – 1998. – Т. XLII, №5. – С. 140–6.
15. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. – В кн.: «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» под общей ред. чл.-корр. РАМН проф. Р.У. Хабриева. – 2 изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Медицина», 2005. – С. 637–51.
16. Чиссов В.И., Якубовская Р.И., Панкратов А.А. и др. Бинарные каталитические системы как новые противоопухолевые агенты // Материалы 5 Всероссийского съезда онкологов «Высокие технологии в онкологии». – Казань, 4–7 октября 2000 г. – Т. 1. – С. 234–5.
17. Chabner BA, Longo DL. Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice, 3rd ed. – Philadelphia: Lippincott-Raven., 2004. – P. 678–99.
18. Fisher B., Brodien A., Mamounas E. et al. Effect of Preoperative Chemotherapy on Local-Regional Disease in Women With Operable Breast Cancer: Findings From National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B 18 // J. Clin Oncol. – 1997. – Vol. 15. – P. 2483–93.

А.Ф. Лазарев, В.Д. Петрова, Н.А. Михеева, Е.Л. Секержинская, Т.В. Синкина

ОЦЕНКА ПЕРЕНОСИМОСТИ АНАСТЕРЫ У ПАЦИЕНТОК С ПРОГРЕССИРУЮЩИМ РМЖ

Алтайский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН,

ГУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер», Барнаул

Актуальность. Лечение метастатического рака молочной железы может включать в себя хирургическое вмешательство и лучевую терапию. Но, на сегодняшний день, установлено, что главным в программе специального лечения данных пациенток является системное воздействие – проведение химио- и эндокринотерапии. Для больных с гормональным рецептор-положительным раком молочной железы, эндокринное лечение представляет терапевтический выбор, который обладает лучшими профилями безопасности, нежели цитотоксическая химиотерапия. Как правило, при генерализации процесса имеет место резистентность к тамоксифену, и назначают препараты третьего поколения – ингибиторы ароматазы: анастрозол, летрозол и экземестан. В 2006 г. в России зарегистрирован препарат Анастера, который также является ингибитором ароматазы. Однако широкого опыта применения данного препарата нет.

Задачей пилотного исследования явилась оценка переносимости и побочных действий препарата «Анастера».

Материал и методы. В данном исследовании были оценены переносимость и побочные действия у 28 пациенток с генерализованным раком молочной железы, имевших положительный гормональный статус. Средний возраст пациенток составил 58,7 лет, (менопауза более 5 лет). В анамнезе они все получили комбинированное и комплексное лечение по поводу рака молочной железы и антиэстрогенную эндокринотерапию тамоксифеном в качестве адьювантного режима. Функциональный статус по ВОЗ (ECOG) составил 0-2 балла. Препарат Анастера назначали один раз в день по 1 таблетке (1 мг) в течение 3 мес. Сведения о побочных действиях и переносимости анализировали с помощью анкетирования один раз месяц. Оценивали следующие побочные эффекты: наличие тошноты и рвоты, слабости, анорексии или повышенного аппетита, головных болей, приливов, бессонницы, запоров или диареи, сыпи, периферических отеков, повышенного давления, набора веса, вагинальных кровотечений, потливости, артралгий.

В качестве группы сравнения были выбраны 29 пациенток, сопоставимых по всем характеристикам с исследуемой группой, получавших в течение 3 мес препарат Аримидекс.

Результаты. Наиболее часто пациентки, получавшие препарат Анастера, предъявляли жалобы на приливы и потливость – 9 пациенток, причем у 5 из них, данные симптомы были выражены слабо, у 3 – умеренно и у 1 – сильно. Головную боль отмечали 8 пациенток, у 3 из них, головная боль была слабо выражена и у 5 носила умеренно выраженный характер. Жалобы на слабость, связанную с приемом препарата, отмечали 7 больных (у 3 – слабо выражена, у 4 – умеренно). Остальные побочные действия регистрировались в единичных случаях. Ни у одной из женщин препарат Анастера не был отменен в связи с плохой переносимостью. При сравнении с группой женщин, получавших препарат Аримидекс, достоверных отличий регистрации побочных действий выявлено не было.

Заключение. Препарат Анастера отличается хорошей переносимостью. Побочные действия находятся в диапазоне от слабых до умеренных и не требуют корректировки дозы.

УДК 616-006-089:612.111.22:612.115.3

*А.Ф. Лазарев¹, А.В. Россоха², А.Н. Мамаев¹, С.А. Ходоренко², И.В. Мамаева³, А.В. Назаров², Л.П. Цывкина³, З.С. Баркаган³***ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ФАКТОРА VIIa
ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ТРАНСФУЗИОННОЙ НАГРУЗКИ
ВО ВРЕМЯ ОПЕРАЦИЙ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ**¹Алтайский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 656049, Барнаул²ГУЗ Алтайский краевой онкологический диспансер, Барнаул³Алтайский филиал ГНЦ РАМН, Барнаул**Контактная информация:**

Лазарев Александр Федорович, д-р мед. наук, профессор, директор Алтайского филиала Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН.

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

адрес: 656049, Барнаул, ул. Никитина, д. 77; **тел.** +7(3852)63-26-20**e-mail:** doc@ctmed.ru

Статья поступила: 16.03.2009 г., принята к печати: 23.09.2009 г.

Резюме

Геморрагические осложнения, сопровождающие хирургические вмешательства по поводу злокачественных образований, нередко требуют переливания значительных объемов гемопрепаратов, которые могут приводить к различным осложнениям. В работе показано, что применение рекомбинантного фактора VIIa позволяет снизить объем кровопотери и уменьшить гемотрансфузионную нагрузку у онкологических больных, которым выполняются хирургические вмешательства по поводу метастазов колоректального рака в печень, рака предстательной железы и мочевого пузыря.

Ключевые слова: кровопотеря, рекомбинантный активированный фактор VII, трансфузионная нагрузка, эритроцитная масса, СЗП.

*A.F. Lazarev¹, A.V. Rossokha², A.N. Mamaev¹, S.A. Khodorenko², I.V. Mamaeva³, A.V. Nazarov², L.P. Tsyvkina³, Z.S. Barkagan³***RECOMBINANT FACTOR VIIa
REDUCES THE TRANSFUSION VOLUME
DURING THE OPERATION OF CANCER PATIENTS**¹Altay Affiliation of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Barnaul²Altay Regional Oncology Dispensary, Barnaul³Altay Affiliation of Hematology Research Center, Barnaul**Abstract**

Hemorrhage side-effects accompanied the surgical operation of malignant tumors quite often require the transfusion of enormous volume of hemopreparations and, consequently, may lead to different complications. This article shows that the use of recombinant activated factor VIIa reduces the volume of bleeding and diminish transfusion volume of cancer patients under operation on the occasion of metastases of colorectal cancer into the liver, prostate and bladder cancer.

Key words: bleeding, recombinant activated factor VII, transfusion volume, red blood cells mass, FFP.

Введение

Кровотечения, как известно, являются серьезными осложнениями расширенных онкологических операций. При этом массивная кровопотеря и проводимая инфузионная терапия во время хирургических вмешательств по поводу злокачественных образований нередко приводят к анемии, потере и разведению плазменных факторов свертывания, нарушению тромبوцитарного звена гемостаза и активации фибринолиза. Проводимая заместительная терапия для восстановления кислородной емкости и свертывающей системы крови, требует переливания больших объемов эритроцитной массы и свежезамороженной плазмы. В свою очередь инфузии препаратов, изготовленных из донорской крови, по-прежнему остаются опасными, поскольку могут иметь неблагоприятные последствия в связи с возможной передачей вирусных и бактериальных инфекций, а также зачастую сопряжены с различными проявлениями трансфузионных осложнений, иммуносупрессией, метаболическими расстройствами

и коагулопатией [5; 6; 11; 13; 17]. В последние годы идет поиск новых препаратов способных уменьшить кровопотерю и снизить гемотрансфузионную нагрузку. С целью профилактики и терапии кровотечений различной этиологии все чаще применяют рекомбинантный активированный фактор VII (RVIIa) [1–4; 7–10; 12; 14–16], однако данных о его использовании для профилактики кровопотери в онкологической практике пока немного. Кроме того, мало данных о путях снижения гемотрансфузионной нагрузки онкобольным, у которых оперативное лечение ведет к значительной кровопотере. В настоящем исследовании представлен собственный опыт профилактического применения препарата рекомбинантного фактора VIIa (Новосэвен, NOVO NORDISK, A/S) для уменьшения кровопотери во время оперативного лечения онкологических заболеваний. Для профилактики препарат применяли онкобольным урологического профиля с метастазами колоректального рака в печень, поскольку у этой группы пациентов в связи с особенностями операции кровопотеря зачастую очень бывает весьма значительной.

Материалы и методы

Для уточнения эффективности гVIIa с целью профилактики интраоперационных кровотечений у онкологических больных мы использовали дизайн исследования в формате «случай–контроль».

Для этого исследуемую и контрольную группы формировали случайным образом. Критерием включения в исследование были больные, которым проводились радикальные оперативные вмешательства по поводу колоректального метастатического поражения печени, а так же больные со злокачественными образованиями мочевого пузыря и предстательной железы, у которых вследствие распространенности онкологического процесса предполагалась интраоперационная кровопотеря больше 30 % от должного ОЦК.

Учитывая, что опухолевые клетки экспрессируют на своей поверхности тканевой фактор, который является одной из точек приложения гVIIa, было принято решение не применять дозу препарата больше 100 мкг/кг, во избежание возникновения тромбозов, которые нередко возникают у этой группы пациентов. Именно поэтому для профилактики кровопотери каждому пациенту основной группы применяли лишь один флакон препарата «Новосвен», содержащий 4,8 мг гVIIa, что с учетом массы тела составило 40–98 мкг/кг. Препарат вводился после ревизии брюшной полости (перед началом осуществления процедуры удаления органа). Распределение пациентов с учетом применяемой дозы гVIIa выглядит следующим образом: четырем больным его вводили в дозе 40–60 мкг/кг, у 10 пациентов – 60–80 мкг/кг, у 2 – больше 80 мкг/кг.

Локализации и стадии опухоли у пациентов основной группы: рак предстательной железы – 3 больных (2 больных $T_2N_0M_0$, 1 – $T_1N_0M_0$), рак мочевого пузыря – 3 больных ($T_3N_0M_0$), 10 больных с метастазами колоректального рака в печень.

Группа сравнения была представлена 20 пациентами (8 онкоурологических больных и 12 пациентов с метастазами колоректального рака в печень), которым профилактика кровотечений рекомбинантным активированным фактором VII не проводилась. Диагноз во всех случаях был верифицирован морфологически.

Пациентам основной группы были выполнены операции по поводу колоректального метастатического поражения печени, 6 расширенных правосторонних и 4 левосторонних гемигепатэктомии. У одного пациента левосторонняя гемигепатэктомия сочеталась с резекцией VI сегмента.

Онкологическим больным урологического профиля, которым применяли рекомбинантный фактор VIIa с профилактической целью, были выполнены 3 цистпростатвезикулэктомии, 2 из них – с пластикой мочевого пузыря, и 3 расширенных простатвезикулэктомии. Всем пациентам основной группы во время хирургического вмешательства проводилась сочетанная (внутривенная общая и эпидуральная) анестезия.

В группе сравнения 12 пациентам были выполнены операции на печени по поводу метастатического рака толстой кишки. 7 – расширенная правосторонняя гемигепатэктомия, в том числе 1 – с резекцией II и V сегментов. Левосторонняя гемигепатэктомия была выполнена 4 больным, в том числе 1 – с резекцией нижней полой вены. 1 пациенту была произведена резекция II, V и VII сегментов печени. В этой группе также были выполнены операции больным со злокачественными образованиями

мочевого пузыря и предстательной железы. 4 пациентам произведены цистпростатвезикулэктомии, в том числе 2 – с пластикой мочевого пузыря, и 4 расширенных простатвезикулэктомии. Всем пациентам группы сравнения во время хирургического вмешательства проводилась сочетанная (внутривенная общая и эпидуральная) анестезия.

Объем кровопотери оценивали в операционной гравиметрическим методом и определением объема аспирированной из операционной раны крови.

Показания для трансфузии эритроцитарных сред всякий раз формировали индивидуально, при этом мы не использовали эритроцитную массу при уровне гемоглобина выше 80 г/л, отсутствии клинических проявлений гипоксии и без сопутствующей патологии, при которой заниженные значения гемоглобина могли привести к декомпенсации.

Объемы переливания СЗП зависели от клинической ситуации (объем кровопотери больше 30 % от должного ОЦК, при трансфузиях солевых и коллоидных растворов более одного ОЦК), а также выраженности коагулопатии потребления.

Результаты, полученные при исследовании показателей больных основной группы и группы сравнения, представлены в виде среднее арифметическое $\pm$ ошибка выборки.

Для вычисления статистической значимости различий выборки использовали критерий Колмогорова-Смирнова.

Результаты и обсуждение

В основной группе, где применяли рекомбинантный активированный фактор VII с целью профилактики, обнаружено снижение кровопотери во время операции.

Как следует из рис. 1, объем кровопотери во время операции у больных с профилактическим применением гVIIa, был равен $1204,4 \pm 115,7$ мл, для группы пациентов, которым не применяли профилактические мероприятия гVIIa, этот показатель был выше и составил $2625,0 \pm 417,4$ мл (различия статистически значимы, $P 0,01$).

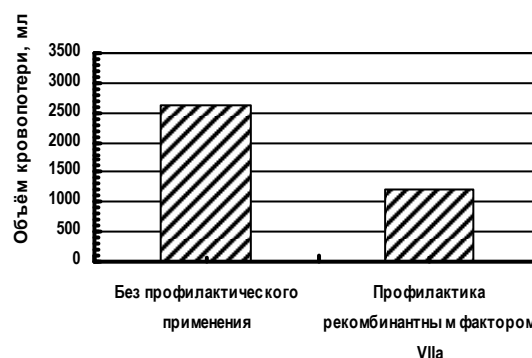


Рис. 1. Объем кровопотери во время операции при профилактическом применении рекомбинантного фактора VIIa и в группе сравнения.

Учет нагрузки гемопрепаратами показал, что при профилактическом применении рекомбинантного фактора VIIa во время операции и в течение первых суток после хирургического вмешательства (рис. 2; см. на стр. 59) было перелито эритроцитной массы в среднем 199 ± 62 мл.

В группе сравнения этот объем был значительно выше и составил в среднем 796 ± 143 мл ($P 0,001$).

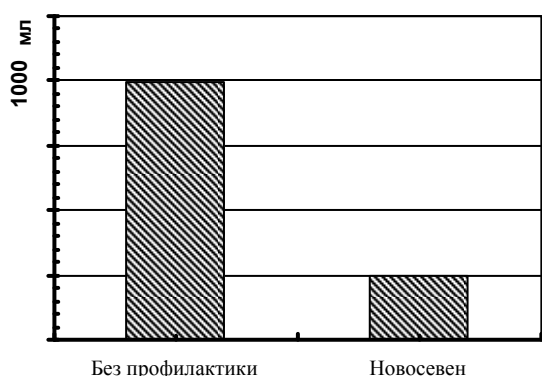


Рис. 2. Объем эритроцитной массы (мл) использованной во время операции при профилактическом применении рекомбинантного фактора VIIa и в группе сравнения.

Следует особо отметить, что в 6 случаях во время операции при профилактическом применении rVIIa не было необходимости применения эритроцитной массы.

При учете объема СЗП, используемой во время и в первые сутки после операции (рис. 3), обнаружено: в группе профилактического применения рекомбинантного фактора VIIa перелито 914 ± 78 мл СЗП, а в группе сравнения – 1378 ± 209 мл (различия статистически значимы, $P < 0,05$). Рекомбинантный фактор VIIa все чаще используется для лечения кровотечений различной этиологии.

В нашем исследовании указанный препарат «Новосевен» успешно применили еще до развития

предполагаемого кровотечения во время хирургического лечения опухолевой патологии.

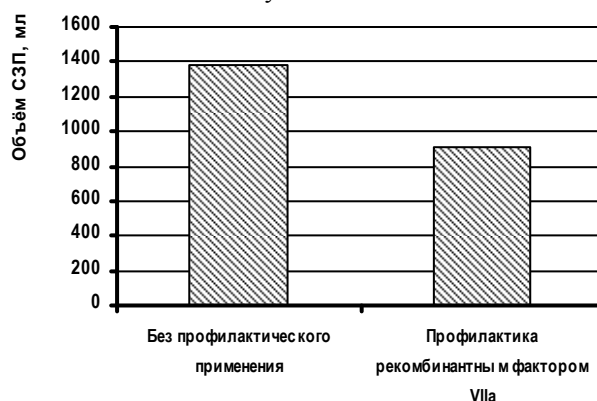


Рис. 3. Объем СЗП (мл) во время операции при профилактическом применении рекомбинантного фактора VIIa и в группе сравнения.

Это позволило уменьшить объем кровопотери и существенно снизить нагрузку компонентами донорской крови.

Выводы

Профилактическое применение rVIIa существенно уменьшает кровопотерю и трансфузионную нагрузку во время и после хирургического лечения пациентов со злокачественными новообразованиями мочеполовой системы и больных, оперированных по поводу метастазов колоректального рака в печень.

Литература

1. Баркаган З.С. Новые универсальные методы гемостатической терапии // Успехи современного естествознания. – 2003. – № 10. – С. 52.
2. Баркаган З.С., Мамаев А.Н., Морозова Л.И., Мамаева И.В. Опыт применения рекомбинантного активированного фактора VII в терапии острого ДВС-синдрома. // Омский научный вестник – 2005. – Т. 30, № 1. – С. 85–6.
3. Баркаган З.С., Мамаев А.Н., Морозова Л.И. и др. Опыт успешного применения рекомбинантного фактора VIIa (Новосевен) в терапии терминальных акушерских кровотечений / Новые медицинские технологии в акушерстве, гинекологии и неонатологии. Клин. лекции, тезисы докл. – М., 2005. – С. 21–3.
4. Баркаган З.С., Мамаев А.Н., Ходоренко С.А. и др. Опыт применения препарата Новосевен в терапии терминальных кровотечений. // Омский научн. вестник. – 2005. – Т. 30, № 1. – С. 86–7.
5. Горобец Е.С., Буйденко Ю.В., Николаева Е.Н. Риск переливания крови онкологическим больным // Анестезиология и интенсивная терапия. – 1999. – № 2. – С. 55–8.
6. Константинов Б.А., Рагимов А.А., Дадвани С.А. Трансфузиология в хирургии. – М: Аир-Арт, 2000. – 242 с.
7. Плющ О.П., Андреев А.Н., Городецкий В.М. и др. Рекомбинантный активированный фактор VII в клинической практике. Пособие для врачей гематологов // Пробл. гематол. и переливания крови. – 2004. – № 1. – С. 5–10.
8. Плющ О.П., Копылов К.Г., Городецкий В.М. и др. Новая технология остановки и профилактики кровотечений в клинической практике // Вопр. гематол. и иммунопатологии в педиатрии. – 2003. – № 2. – С. 83–7.
9. Румянцев А.Г., Бабкова Н.В., Чернов В.М. Применение рекомбинантного активированного фактора коагуляции VII в клинической практике. Обзор литературы // Гематол. и трансфузиол. – 2002. – № 5. – С. 36–41.
10. Brown J.B., Emerick K.M., Brown O.L. et al. Recombinant factor VIIa improves coagulopathy caused by liver failure // JPGN. – 2003. – Vol. 37. – P. 268–72.
11. Hardy J.F., Belisle S. Current Information on the Benefits of Allogeneic Blood // TATMJ. – 2000. – Vol. 2, № 3. – P. 15–25.
12. Hedner U. Recombinant activated factor VII as universal hemostatic agent // Blood Coagul. Fibrinolysis. – 1998. – № 9. – P. 147–52.
13. Heiss M.M. Immunosuppression and Transfusion // TATMJ. – 2000. – Vol. 3. – P. 26–31.
14. Kenet G. rFVIIa for profuse bleeding in surgical patients // Bloodline Rev. – 2001. – № 1. – P. 12–3.
15. Kenet G., Walden R., Eldad A. et al. Treatment of traumatic bleeding with recombinant factor VIIa // Lancet. – 1999. – Vol. 354. – P. 1879.
16. Mathew P. The use of rFVIIa in non-hemophilia bleeding conditions in paediatrics // Thromb. Haemost. – 2004. – Vol. 92, № 4. – P. 738–46.
17. Kinoshita Y., Udagawa H., Tsutsumi R. et al. Usefulness of autologous blood transfusion for avoiding allogenic transfusion and infection complication after esophageal cancer resection // Surgery. – 2000. – Vol. 127, № 2. – P. 185–92.

УДК 616.24-006.-08-059

*В.С. Покровский, Е.М. Трещалина, М.Б. Бычков***ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ
ДИССЕМИНИРОВАННОГО МЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО**

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация:

Покровский Вадим Сергеевич, аспирант, лаборант-исследователь лаборатории комбинированной терапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии.

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24**e-mail:** vadimpokrovsky@yandex.ru

Статья поступила: 19.12.2008 г., принята к печати: 23.09.2009 г.

Резюме

Мелкоклеточный рак легкого относится к наиболее злокачественно текущим опухолям и характеризуется быстрым течением, ранним метастазированием. В то же время он оказался высокочувствительным к химиотерапии и лучевой терапии. Полихимиотерапия является основным методом лечения МРЛ. Эффективность современной ПХТ в комбинации с лучевой терапией при локализованном МРЛ достигает 80–90% с полной ремиссией у 20–25% больных. При распространенном МРЛ эти показатели составляют 60–70 и 10% соответственно. Однако, несмотря на высокую чувствительность к противоопухолевым препаратам, для МРЛ характерны высокая частота рецидивирования и быстрое прогрессирование. Медиана выживаемости при локализованном МРЛ равна 18–24 мес., при распространенном – 8–10 мес. Эффективность ПХТ 2-й линии лечения МРЛ сравнительно низка, и в связи с этим требуется разработка новых режимов и схем лечения распространенного МРЛ.

Ключевые слова: мелкоклеточный рак легкого, полихимиотерапия.*V.S. Pokrovsky, H.M. Treshalina, M.B. Bychkov***DEVELOPMENT OF COMBINED CHEMOTHERAPY
IN DISSEMINATED SMALL-CELL LUNG CANCER TREATMENT**

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

Abstract

Small sell lung cancer (SCLC) is highly aggressive tumor. On the other hand SCLC appears to be highly sensitive to radiation and chemotherapy. At present polychemotherapy is the only way to treat patients with SCLC. The efficacy of polychemotherapy in combination with radiation reaches 80–90 %; 20–25 % patients were with no evidence of disease if the tumor was local. If the tumor was wide involvement of adjacent tissue the efficacy of treatment reduce up to 60–70 % and 10 % accordingly. Despite the fact that SCLC is highly sensitive to chemotherapy, this tumor is characterized by local disease advance during a short time and high degree of relapses. Median survival for local disease was 18–24 months, for spread disease – 8–10 months. The efficacy of second line chemotherapy is considerably low. This problem requires further study with employment of new combination of drugs and schedules of their administration.

Key words: small-cell lung cancer, combined chemotherapy.**Введение**

До 1970-х гг. МРЛ не считали самостоятельной нозологической единицей, и результаты лечения рака легкого оценивали без учета гистологического типа. После выделения МРЛ как отдельного заболевания прежде всего появились данные об эффективности адриамицинсодержащих схем, например, *CAV*, и др. В начале 1980-х гг. начали изучать комбинации с производными нитрозомочевины, чуть позже – схемы с этопозидом. В 1990-х гг. появились режимы с включением таксанов и ингибиторов топоизомеразы I (*EP+ IP*). На протяжении последних 20 лет основой лечения больных МРЛ является ПХТ с включением препаратов платины. Эффективность современных схем достигает 80%, 1-летняя выживаемость превышает 50 % [4; 12; 19; 20; 46; 47; 50].

Эффективность 1-й линии лечения МРЛ

Метаанализ рандомизированных исследований (19 исследований, 4054 пациентов) показал, что применение платиносодержащих схем ПХТ достоверно

увеличивает продолжительность и качество жизни при удовлетворительной переносимости [54]. До последнего времени стандартом лечения считали комбинацию *EP*. Эффективность *EP* колеблется от 40 до 70 % при 1-летней выживаемости 30–40 % в зависимости от доз и режимов введения препаратов (табл. 1). Токсичность комбинации *EP* выражена умеренно, что позволяет проводить ПХТ в амбулаторном режиме, и не лимитирует при наличии показаний проведение лучевой терапии. При длительном пероральном приеме этопозида эффективность ПХТ повышается, но при этом значительно возрастает гастроинтестинальная токсичность.

Большинство новых режимов ПХТ разрабатывают на основе стандартной схемы *EP*: либо заменяют этопозид, либо добавляют другие препараты. Так, «золотым стандартом» 1-й линии лечения МРЛ в Японии стала комбинация *IP* (на основе иринотекана), превосходящая по эффективности *EP* при другом профиле токсичности: отсутствие лимитирующей гематологической токсичности при ярко выраженных признаках повреждения желудочно-кишечного тракта [18; 46].

Таблица 1

Эффективность двухкомпонентных комбинаций на основе цисплатина

Комбинация	n пациентов	Эффективность, %	Мед. выживаемости, мес	1-летняя выживаемость, %
Цисплатин Этопозид	395	69	9,4	31 ^[112]
	345	46	9,4	36 ^[20]
	322	55	8,9	33 ^[46]
	282	68	9,9	37 ^[47]
	110	73	9,9	35 ^[50]
	110	44	10,2	35 ^[19]
	109	61	9,3	29 ^[55]
	41	31	9,5	24 ^[40]
Цисплатин Иринотекан	323	59	9,7	39 ^[46]
	221	48	9,3	35 ^[19]
	37	97	11,1	44 ^[18]
	28	89	16,5	67 ^[36]
Цисплатин Топотекан	389	63	9,2	31 ^[112]
	358	56	10,3	40 ^[20]
Цисплатин Гемцитабин	80	53	8,8	28 ^[24]
	46	46	9,0	34 ^[10]
Цисплатин Пеметрексед	40	35	7,6	33 ^[69]
Цисплатин Амрубицин	41	88	13,6	56 ^[49]

Таблица 2

Эффективность трех- и четырехкомпонентных комбинаций на основе цисплатина

Комбинация	n пациентов	Эффективность, %	Мед. выживаемости, мес	1-летняя выживаемость, %
Цисплатин Этопозид Гемцитабин	54	72	10,0	38 ^[9]
	46	52	8,0	36 ^[10]
Цисплатин Этопозид Иринотекан	56	80	15,1	57 ^[52]
	30	83	8,9	40 ^[65]
	30	77	12,9	57 ^[65]
Цисплатин Этопозид Паклитаксел	88	57	11,0	43 ^[27]
	33	45	7,0	19 ^[40]
	283	75	10,6	38 ^[47]
Цисплатин Этопозид Топотекан	21	53	6,6	Нет данных ^[74]
Цисплатин Этопозид Ифосфамид	81	73	9,0	Нет данных ^[38]
Цисплатин Этопозид Нимустин	68	65	11,0	36 ^[5]
Цисплатин Этопозид Адриамицин Циклофосфамид	117	76	10,5	40 ^[55]
	229	72	9,0	30 ^[76]
Цисплатин Этопозид Адриамицин Винкристин	85	87	11,8	Нет данных ^[44]

Таблица 3

Эффективность двухкомпонентных комбинаций на основе карбоплатина

Комбинация	n пациентов	Эффективность, %	Мед. выживаемости, мес	1-летняя выживаемость, %
Карбоплатин Этопозид	110	73	10,6	41 ^[50]
Карбоплатин Иринотекан	34	79	9,7	32 ^[28]
	35	69	11,0	43 ^[70]
Карбоплатин Топотекан	100	84	11,7	40 ^[64]
Карбоплатин Бендамустин	55	73	8,3	Нет данных ^[31]
Карбоплатин Пеметрексед	38	40	10,4	39 ^[69]

Таблица 4

Эффективность трехкомпонентных комбинаций на основе карбоплатина

Комбинация	Число пациентов	Эффективность, %	Медиана выживаемости, мес	1-летняя выживаемость, %
Карбоплатин Иринотекан Иматиниб	68	66	8,4	35 ^[71]
Карбоплатин Паклитаксел Ифосфамид	35	71	9,5	43 ^[68]

Эффективность трехкомпонентных комбинаций на основе карбоплатина					Таблица 4 (окончание)
Карбоплатин Этопозид Топотекан	34	71	10,8	Нет данных ^[15]	
Карбоплатин Этопозид Талидомид	25	68	10,1	40 ^[37]	
Карбоплатин Этопозид Паклитаксел	60	78	10,6	39 ^[16]	

Эффективность комбинаций, не содержащих препараты платины					Таблица 5
Комбинация	Число пациентов	Эффективность, %	Медиана выживаемости, мес	1-летняя выживаемость, %	
Циклофосфамид Адриамицин Этопозид	228	52	8,9	27 ^[76]	
Циклофосфамид Адриамицин Винкристин	97	55	9,9	Нет данных ^[14]	
Гемцитабин Этопозид	42	46	10,5	37 ^[77]	
Паклитаксел Топотекан	36	68	9,4	34 ^[39]	
	32	69	12,6	50 ^[56]	
	38	53	9,1	45 ^[42]	
	60	48	9,1	35 ^[16]	
Паклитаксел Этопозид	55	64	Нет данных	42 ^[53]	
Топотекан Этопозид	28	46	7,0	Нет данных ^[58]	
	15	40	7,0	29 ^[41]	
Иринотекан Этопозид	50	66	11,5	43 ^[32]	
Иринотекан Амрубицин	13	100	17,4	77 ^[51]	
Топотекан Циклофосфамид	42	41	9,0	32 ^[23]	
Гемцитабин Доцетаксел	33	27	4,0	14 ^[17]	

Эффективность комбинаций 2-й линии полихимотерапии МРЛ					Таблица 6
Комбинация	Число пациентов	Эффективность, %	Стабилизация, %	Медиана времени до прогрессирования, мес	
Цисплатин Этопозид	26	35	15	5,2 ^[63]	
Цисплатин Карбоплатин Этопозид	33	48	12	7,8 ^[63]	
Паклитаксел Карбоплатин	32	25	22	3,0 ^[25]	
Топотекан	68*	29	37	4,7 ^[6]	
Цисплатин	42**	24	26	3,0 ^[6]	
Паклитаксел Ифосфамид Цисплатин	33	73	15	4,9 ^[29]	
Иринотекан Карбоплатин	28	31	Нет данных	3,5 ^[45]	
Топотекан Паклитаксел	41	27	Нет данных	4,0 ^[72]	
Иринотекан Гемцитабин	35	17	20	3,4 ^[62]	
	35*	31	31	3,1 ^[59]	
	36**	11	31	1,6 ^[59]	
Паклитаксел Гемцитабин	31	26	Нет данных	2,2 ^[11]	
Гемцитабин Винорельбин	35	6	23	Нет данных ^[57]	

*ремиссия после 1-й линии лечения; **нет ответа на 1-ю линию лечения.

Новые препараты – потенциальные комбинанты для ПХТ МРЛ		Таблица 7
Класс препаратов	Препарат	
Комплексные соединения платины	Оксалиплатин, Сатраплатин, Пикоплатин, ZD0473	
Ингибиторы топоизомеразы I	Белотекан, Лютротексан, СКД-602	
Производные нитрозомочевины	Араноза, Бендамустин	
Антрациклиновые антибиотики	Амрубицин, Сабарубицин	

Эффективность комбинаций *ТС* (на основе топотекана) и *ЕР* сопоставима по выживаемости в течение 1 года и составляет 31 %. Нейтропения при применении *ТС* выражена меньше, чем при использовании *ЕР*, а выраженная тромбоцитопения и анемия встречаются чаще. В целом комбинация *ТС* не уступает *ЕР* по результатам лечения и профилю токсичности, а также по качеству жизни [12; 20].

Сопоставимы с *ЕР* по эффективности и токсичности двухкомпонентные комбинации цисплатина с пеметрекседом, паклитакселом и гемцитабином [10; 21; 69]. Многообещающие результаты получены на II фазе изучения комбинации цисплатина с амрубицином: эффективность 88 % при медиане выживаемости более 13 мес. [49].

Добавление третьего препарата к *ЕР* повышает эффективность лечения, однако при этом отдаленные результаты улучшаются редко, а токсичность в ряде случаев возрастает (табл. 2). Добавление топотекана к *ЕР* не приводит к увеличению частоты ремиссий и продолжительности жизни больных [74]. Добавление ифосфамида приводит к увеличению выживаемости больных в случае достижения ПР, однако сопровождается выраженной токсичностью, в том числе миелосупрессией III–IV степени, иногда с летальным исходом [38]. Эффективность комбинации *IEP* достигает 80 % при медиане выживаемости более 15 мес. Лечение по схеме *IEP* сопровождается гематологической и гастроинтестинальной токсичностью нелимитирующего характера [52; 65].

В отделении ХТ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН разработана схема *AVP*, показавшая выраженную противоопухолевую активность при МРЛ и, что особенно важно, при метастазах болезни в ГМ. Недостатки схемы *AVP* связаны с отсроченной миелосупрессией, характерной для производных нитрозомочевины, и необходимостью длительного контроля кроветворной функции [5].

Замена цисплатина на карбоплатин не приводит к снижению эффективности ПХТ при более низкой нефротоксичности, но сопровождается более выраженной миелосупрессией. Комбинации с этопозидом, иринотеканом и паклитакселом аналогичны по эффективности двухкомпонентным комбинациям с цисплатином (табл. 3). Так, эффективность схемы *ЕС* колеблется от 50 до 80 %, а медиана продолжительности жизни иногда достигает 12 мес. Эффективность комбинации топотекан+карбоплатин достигает 84 % при медиане выживаемости 11,7 мес. Токсичность выражена умеренно, лимитирует лечение миелосупрессия [64]. Трехкомпонентные комбинации на основе карбоплатина аналогичны по эффективности соответствующим комбинациям с цисплатином: 70–80 %, медиана выживаемости 11 мес (табл. 4). Однако выраженная гематологическая токсичность карбоплатина не позволяет включать в схемы ПХТ другие препараты с аналогичным спектром токсичности. Так, схема ифосфамид + карбоплатин + этопозид оказалась высокоэффективной, но лимитированной гематологической токсичностью [9].

Добавление к *ЕС* облимерсена (антисенс *bcl-2* олигонуклеотид) не увеличивает частоту ремиссий (61 и 60 %), однако существенно уменьшает 1-летнюю выживаемость больных: 47 % в случае *ЕС* и 24 % для *ЕС* с облимерсеном. При этом значительно повышается гематологическая токсичность лечения [60]. Добавление к *ЕС* талидомида также снижает эффективность лечения и приводит к увеличению токсичности [37].

Несмотря на то, что комбинации с препаратами платины являются основой ПХТ МРЛ, в некото-

рых случаях назначают схемы без них. Так, пациентам с метастазами в ГМ показаны производные нитрозомочевины, триазены и другие препараты, проникающие через ГЭБ. Эффективность таких комбинаций несколько уступает схемам с включением препаратов платины и колеблется от 40 до 70% при 1-летней выживаемости менее 50 % (табл. 5). Многообещающие результаты получены при изучении комбинации иринотекана с новым антрациклиновым антибиотиком амрубицином: частота ремиссий достигает 100 %, 1-летняя выживаемость – 77 %. Однако малое число наблюдений (n=13) снижает его значимость [51].

Альтернирующие режимы

Попытки увеличить эффективность ПХТ за счет повышения разовых доз препаратов были неудачными. Практически во всех доступных исследованиях эффективность комбинаций при плановых и высоких дозах препаратов оказалась сопоставимой, а токсичность при высоких дозах – значительной. Сокращение интервалов между введениями препаратов также не приводило к увеличению эффективности. Предполагалось также, что одним из возможных путей повышения эффективности ПХТ станет чередование различных схем лечения, т.н. альтернирующие режимы. Но одновременно с повышением эффективности появлялась выраженная токсичность, которая иногда приводила к летальному исходу и не позволила рекомендовать такие режимы для широкого применения [73; 75].

Эффективность 2-й линии химиотерапии

Поскольку после 1-й линии ПХТ рецидив МРЛ развивается у 80 % пациентов с локализованным и почти у 100 % с диссеминированным процессом, отдаленный прогноз крайне неблагоприятный. 2-я линия ПХТ достоверно увеличивает продолжительность и улучшает качество жизни пациентов с диссеминированным МРЛ. Выбор схемы для 2-й линии ХТ зависит, главным образом, от характера ответа на схему 1-й линии, а также от срока после окончания лечения. При химиочувствительном рецидиве МРЛ, т.е. развившемся более чем через 3 мес. после окончания лечения, высока вероятность ответа на ПХТ по той же схеме на 2-й линии. При возникновении рецидива в более ранние сроки схема лечения заменяется. Эффективность схемы *ЕР* во 2-й линии лечения (после *CAV*) не превышает 25–30 %, а эффективность схемы *CAV* (после *ЕР*) колеблется от 9 до 20 %. Современные схемы ПХТ 2-й линии лечения МРЛ включают ингибиторы топоизомеразы I (иринотекан, топотекан), винкаалкалоиды (винорельбин), таксаны, гемцитабин и др. (табл. 6). Так как «золотым стандартом» 2-й линии лечения МРЛ в настоящее время считают монотерапию топотеканом, перспективно изучение двухкомпонентных схем с его включением. В частности, эффективность комбинаций с цисплатином, паклитакселом или этопозидом достигает 30 % при медиане продолжительности жизни 4–7 мес [6].

Новые препараты

Источником поиска новых препаратов для ПХТ МРЛ являются эксперименты *in vitro* и *in vivo* на адекватных моделях. Первоначальный отбор проводится на культурах клеток МРЛ, высокоэффективные вещества тестируются на перевиваемых опухолях мышей и подкожных ксенографтах МРЛ человека у иммунодефицитных животных, после чего начинаются клинические испытания. Современные препараты, которые можно считать перспективными комбинациями для ПХТ, представлены в табл. 7.

Комплексные соединения платины продолжают оставаться основой схем ПХТ МРЛ, несмотря на ряд существенных недостатков. Так, для цисплатина характерна выраженная нефротоксичность и нейротоксичность, а для карбоплатина – гематологическая токсичность. Известны новые препараты платины с эффективностью при МРЛ. В частности, резистентные к цисплатину клетки оказались чувствительными к оксалиплатину. Пероральные препараты платины пикоплатин и сатраплатин, синтезированные в 1990-х гг., были изучены в клинике. Сатраплатин был эффективен при МРЛ у 10 из 26 пациентов (частичная ремиссия) при умеренной гематологической и гастроинтестинальной токсичности и полном отсутствии нефротоксичности [13].

На доклинических испытаниях находятся и другие комплексные соединения платины, например, *ZD0473*, который показал эффективность на культурах клеток МРЛ в комбинации с гемцитабином, паклитаксолом, доцетаксолом, винорельбином, иринотеканом и пеметрекседом [26].

Ингибиторы топоизомераз

Вторым по значению классом препаратов, активных при МРЛ, по праву следует считать ингибиторы топоизомераз, в том числе производные камптотецина (белотекан, лютротекан и др.). Ремиссия после применения белотекана в монотерапии МРЛ в качестве 1-й линии лечения отмечена у 7 из 11 (64 %) пациентов [35]. Также в 1-й линии лечения эффективность белотекана в комбинации с цисплатином изучена у 17 пациентов с распространенным МРЛ, частичная ремиссия отмечена у 13 пациентов (76 %) [34].

Эффективность лютротекана изучена у 66 больных с рецидивом МРЛ после 1-й линии: частичная ремиссия отмечена у 10 % больных с МРЛ, не ответивших на 1-ю линию и у 21 % больных с ремиссией после 1-й линии, стабилизация – у 32 % больных. Лимитирует лечение нейтропения и тромбоцитопения, для препарата нехарактерна гастроинтестинальная токсичность [66].

Эффективность некоторых других ингибиторов топоизомеразы I изучена на подкожных гетеротрансплантатах МРЛ у бестимусных мышей. Например, показана эффективность липосомального *CKD-602* на гетеротрансплантатах *H82* [78].

Производные нитрозомочевины начали использовать при МРЛ в конце 1970-х гг. Схемы с включением нимустина и ломустина демонстрировали высокую эффективность, однако небольшой диапазон терапевтических доз и выраженная отсроченная гематологическая токсичность плохо прогнозировались и приводили к необходимости постоянного контроля состояния кровотока. В последние годы изучаются новые препараты из класса нитрозопроизводных – бендамустин и араноза. Эффективность бендамустина изучена у 21 пациента с рецидивом МРЛ после 1-й линии лечения. У 6 пациентов отмечена частичная регрессия, и у 6 – стабилизация процесса. Лимитирует лечение нейтропения [61]. Эффективность комбинации бендамустина с карбоплатином в качестве 1-й линии лечения достигает 73 % при медиане выживаемости 8,3 мес [31].

Араноза – отечественный препарат из группы нитрозопроизводных мочевины. Для аранозы характерны большой диапазон терапевтических доз, отсутствие отсроченной гематологической токсичности и высокая эффективность при применении в комбинации с комплексными соединениями платины

и другими противоопухолевыми препаратами [3]. Комбинация аранозы с доксорубицином и винкристином не уступает по эффективности наиболее распространенным схемам 2-й линии лечения, например монотерапии топотеканом, при благоприятном профиле токсичности. Эффективность *ArDV* в качестве 2-й линии лечения МРЛ составляет 23 %, медиана продолжительности жизни – 7 мес. Комбинация высокоэффективна при метастазах в головной мозг. Токсичность не лимитирует лечение, проявляется в основном кратковременной анемией, лейкопенией и тромбоцитопенией I–II степени [2].

Противоопухолевые антибиотики

Среди противоопухолевых антибиотиков следует отметить новые антрациклины амрубицин и сабарубицин. Изучена эффективность амрубицина в комбинациях с цисплатином, топотеканом, иринотеканом и карбоплатином. Эффективность комбинации с цисплатином достигает 88 %, с иринотеканом – 100 % [49, 51].

На ксенографтах МРЛ у бестимусных мышей высокоэффективна комбинация цисплатина с сабарубицином [7].

Таргетная терапия

В конце 1990-х гг. большие надежды возлагали на таргетные (адресные) препараты, в том числе ингибиторы ангиогенеза, блокаторы передачи внутриклеточных сигналов и др. Однако результаты клинического изучения многих таргетных препаратов не оправдали этих надежд. Так, при диссеминированном МРЛ неэффективными оказались селективный ингибитор тирозинкиназы рецепторов эпидермального фактора роста *HER-1* гефитиниб (Иресса), ингибитор фарнезилтрансферазы типифарниб, ингибитор антиапоптозных сигнальных путей *bcl-2* бортезомиб, ингибитор матриксных металлопротеиназ маримастат, ингибитор *m-TOR* темсиролимус и др. [22, 33, 43, 67]. Таким образом, следует признать, что на современном этапе развития лекарственной терапии таргетные препараты не способны решить проблему лечения МРЛ. Можно ожидать, что в отдаленной перспективе терапевтически значимые мишени для таргетной терапии найдут свою нишу, но ближайшее будущее ПХТ МРЛ связано с созданием и изучением новых препаратов из уже известных групп «традиционных» цитостатиков.

Еще один способ лечения основан на особенностях регуляции роста и деления клеток с помощью внеклеточных механизмов. Клетки МРЛ часто секретируют различные биологически активные вещества и экспрессируют на поверхности рецепторы к ним. Так, при гиперэкспрессии рецепторов к соматостатину на ксенографтах МРЛ показана эффективность аналогов соматостатина, конъюгированных с флюоресцеином или родамином [30]. На культурах клеток и ксенографтах МРЛ также эффективен антагонист брадикинина *CU201*. Препарат эффективен как в монотерапии, так и в комбинации с цисплатином, адриамицином, этопозидом, винорельбином и паклитаксолом [8].

Одна из возможных причин лекарственной устойчивости опухолевых клеток к антрациклиновым антибиотикам, винкаалкалоидам, подофиллотоксинам, таксанам и другим препаратам связана с высокой активностью *P*-гликопротеина, который «выбрасывает» препараты из клетки. Введение хинолинового деривата *MS-209* ингибирует рост подкожных ксенографтов МРЛ и уменьшает резистентность клеток к этопозиду и адриамицину [48].

Заключение

В последние годы были предприняты многочисленные попытки изучения новых лечебных стратегий, а также изменения уже существующих схем ПХТ путем добавления третьего препарата к двухкомпонентным схемам или увеличения доз применяемых препаратов под «прикрытием» колониестимулирующих факторов или аутооттрансплантации клеток костного мозга. Некоторые новые схемы лечения оказались более эффективны, чем «золотой стандарт» 1990-х гг. *EP*, однако качественно улучшить отдаленные результаты лечения диссеминированного МРЛ пока не удалось. При увеличении эффективности ПХТ зачастую одновременно повышается токсичность, и не изменяются отдаленные результаты лечения.

Отдаленные перспективы лекарственного лечения диссеминированного МРЛ связаны с изучением молекулярной биологии опухолевого роста и разработкой новых таргетных препаратов, направленных на терапевтически значимые мишени, поиск которых постоянно продолжается. Однако, учитывая низкую эффективность при МРЛ современной таргетной терапии, не теряет актуальности и разработка схем ПХТ на основе новых «традиционных» цитостатиков, учитывающая механизмы действия и особенности спектра токсичности комбинируемых препаратов. Так, высокоэффективными препаратами для ПХТ могут стать новые комплексные соединения платины (пикоплатин, сатраплатин), ингибиторы топоизомеразы I (люротекан, белотекан), противоопухолевые антибиотики (амрубицин, сабарубицин) и производные нитрозомочевины (бендамустин, араноза).

Литература

1. Бычков М.Б., Дгебуадзе Э.Н., Большакова С.А. Мелкоклеточный рак легкого // Практическая онкология. – 2005. – № 4. – С. 213–9.
2. Кузьминов А.Е. Разработка новых режимов комбинированной химиотерапии диссеминированного мелкоклеточного рака легкого. Авторефер. дис... канд. мед. наук – М., 2007. – 28 с.
3. Манзюк Л.В., Бородкина А.Г., Артамонова Е.В. и др. Опыт применения лекарственных комбинаций на основе аранозы в лечении диссеминированной меланомы кожи // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2000. – № 2. – С. 27–30.
4. Орел Н.Ф. Пути повышения эффективности консервативного лечения мелкоклеточного рака легкого. Авторефер. дис... д-ра мед. наук – М., 1997. – 44 с.
5. Семина О.В. Новые производные нитрозомочевины в лечении мелкоклеточного рака легкого. Автореферат канд. дисс. – М., 2003. – 27 с.
6. Ardizoni A., Manegold C., Debruyne C. et al. Phase II study of topotecan in combination with cisplatin as second-line treatment of refractory and sensitive small-cell lung cancer // Clin. Cancer Res. – 2003. – 9. – P. 143–50.
7. Bigioni M., Benzo A., Irrissuto C. et al. Antitumour effect of combination treatment with sabarubicin and cisplatin in human lung tumour xenograft // Cancer Chemother. Pharmacol. – 2008. – Vol. 62. – P. 621–9.
8. Chan C.D., Gera L., Stewart J.M. et al. Bradykinin antagonist dimer, CU201, inhibits the growth of human lung cancer cell lines in vitro and in vivo and produces synergistic growth inhibition in combination with other antitumor agents // Clin. Cancer Res. – 2002. – Vol. 8. – P. 1280–7.
9. De Marinis F., Migliorino M.R., Paoluzzi L. et al. Phase I/II trial of gemcitabine plus cisplatin and etoposide in patients with small cell lung cancer // Lung Cancer. – 2003. – Vol. 39(3). – P. 331–8.
10. De Marinis F., Nelli F., Lombardo M. et al. A multicenter, randomized, phase II study of cisplatin, etoposide, and gemcitabine or cisplatin plus gemcitabine as first-line treatment in patients with poor-prognosis small-cell lung carcinoma // Cancer. – 2005. – Vol. 103. – P. 772–9.
11. Dongiovanni V., Buffoni L., Berruti A. et al. Second-line chemotherapy with weekly paclitaxel and gemcitabine in patients with small-cell lung cancer pretreated with platinum and etoposide: a single institution phase II trial // Cancer Chemother. Pharmacol. – 2006. – Vol. 58. – P. 203–9.
12. Eckardt J.R., von Pawel J., Papai Z. et al. Open-label, multicenter, randomized, phase III study comparing oral topotecan/cisplatin versus etoposide/cisplatin as treatment for chemotherapy-naïve patients with extensive-disease small-cell lung cancer // J. Clin. Oncol. – 2006. – Vol. 24. – P. 2044–51.
13. Fokkema E., Groen H.J.M., Bauer J. et al. Phase II study of oral platinum drug JM216 as first-line treatment in patients with small-cell lung cancer // J. Clin. Oncol. – 1999. – Vol. 17. – P. 3822–7.
14. Fukuoka M., Furuse K., Saijo N. et al. Randomized trial of cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine versus cisplatin and etoposide versus alternation of these regimens in small-cell lung cancer // J. Natl. Cancer Inst. – 1991. – Vol. 83. – P. 855–61.
15. Gillenwater H.H., McCune J.S., Lindley C. et al. A phase I trial defining the maximum tolerated systemic exposure of topotecan in combination with carboplatin and etoposide in extensive-stage small-cell lung cancer // Cancer Invest. – 2005. – Vol. 23. – P. 511–9.
16. Greco F.A., Thompson D.S., Morrissey L.H. et al. Paclitaxel/carboplatin/etoposide versus paclitaxel/topotecan for extensive-stage small-cell lung cancer: randomized, prospective phase II trial // The Oncologist. – 2005. – Vol. 10. – P. 728–33.
17. Hainsworth J.D., Carrell D., Drengler R.L. et al. Weekly combination chemotherapy with docetaxel and gemcitabine as first-line treatment for elderly patients and patients with poor performance status who have extensive-stage small-cell lung carcinoma // Cancer. – 2004. – Vol. 100. – P. 2437–41.
18. Han J.Y., Lee D.H., Lee S.Y. et al. A phase II study of dose-intensified weekly concomitant administration of cisplatin and irinotecan in chemonaïve patients with extensive-disease small-cell lung cancer // Med. Oncol. – 2005. – Vol. 22. – P. 281–90.
19. Hanna N., Bunn P.A., Langer C. et al. Randomized phase III trial comparing irinotecan/cisplatin with etoposide/cisplatin in patients with previously untreated extensive-stage disease small cell lung cancer // J. Clin. Oncol. – 2006. – Vol. 24(13). – P. 2038–43.

Литература (продолжение)

20. *Heigener D.F., Freitag L., Eschbach C. et al.* Topotecan/cisplatin compared to cisplatin/etoposide for patients with extensive-stage small-cell lung cancer: final results of randomized phase III trial // Program. and abstracts of the American Society of Clinical Oncology 44th Annual Meeting. – 2008. – Abstr. 7513.
21. *Hesketh P.J., Chansky K., Israel V. et al.* Phase II study of gemcitabine and cisplatin in patients with previously untreated extensive stage small-cell lung cancer // J. Thorac. Oncol. – 2007. – Vol. 2. – P. 440–4.
22. *Heymach J.V., Johnson D.H., Khuri F.R. et al.* Phase II study of the farnesyl transferase inhibitor R115777 in patients with sensitive relapse small-cell lung cancer // Ann. Oncol. – 2004. – Vol. 15. – P. 1187–93.
23. *Hobdy E.M., Kraut E., Masters G. et al.* A phase II study of topotecan and cyclophosphamide with G-CSF in patients with advanced small-cell lung cancer // Cancer Biol Ther. – 2004. – Vol. 3. – P. 89–93.
24. *Jett J.R., Hatfield A.K., Hillman S. et al.* Alternating chemotherapy with etoposide plus cisplatin and topotecan plus paclitaxel in patients with untreated, extensive-stage small-cell lung carcinoma: a phase II trial // Cancer. – 2003. – Vol. 97. – P. 2498–503.
25. *Kakolyris S., Mavroudis D., Tsavaris N. et al.* Paclitaxel in combination with carboplatin as salvage treatment in refractory small-cell lung cancer: a multicenter phase II study // Ann. Oncol. – 2001. – Vol. 12. – P. 193–7.
26. *Kanzawa F., Akiyama Y., Saijo N., Nishio K. et al.* In vitro effects of combinations of cis-Amminedichloro (2-methylpyridine) platinum (II) with other novel anticancer drugs on the growth of SBC-3, a human small-cell lung cancer cell line // Lung Cancer. – 2003. – Vol. 40. – P. 325–32.
27. *Kelly K., Lovato L., Bunn P.A. et al.* Cisplatin, etoposide, and paclitaxel with granulocyte colony-stimulating factor in untreated patients with extensive-stage small cell lung cancer: a phase II trial of the Southwest Oncology Group // Clin. Cancer Res. – 2001. – Vol. 7(8). – P. 2325–9.
28. *Kinoshita A., Fukuda M., Soda H. et al.* Phase II study of irinotecan combined with carboplatin in previously untreated small-cell lung cancer // Br. J. Cancer. – 2006. – Vol. 94. – P. 1267–71.
29. *Kosmas C., Tsavaris N.B., Malamou N.A. et al.* Phase II study of paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin as second-line treatment in relapsed small-cell lung cancer // J. Clin. Oncol. – 2001. – Vol. 18. – P. 119–26.
30. *Kostenich G., Livnah N., Bonasera T.A. et al.* Targeting small-cell lung cancer with novel fluorescent analogs of somatostatin // Lung Cancer. – 2005. – Vol. 50. – P. 319–28.
31. *Koster W., Heider A., Niederle N. et al.* Phase II trial with carboplatin and bendamustine in patients with extensive-stage small-cell lung cancer // J. Thorac. Oncol. – 2007. – Vol. 2. – P. 312–6.
32. *Kudoh S., Nakamura S., Nakano T. et al.* Irinotecan and etoposide for previously untreated extensive-disease small-cell lung cancer: a phase II trial // Lung Cancer. – 2005. – Vol. 49. – P. 263–9.
33. *Lara P.J., Chansky K., Davies A.M. et al.* Bortezomib in relapsed or refractory extensive-stage small-cell lung cancer: a phase II trial // J. Thorac. Oncol. – 2006. – Vol. 1. – P. 996–1001.
34. *Lee D.H., Kim S.W., Bae K.S. et al.* A phase I and pharmacologic study of belotecan in combination with cisplatin in patients with previously untreated extensive-stage disease small-cell lung cancer // Clin. Cancer Res. – 2007. – Vol. 13. – P. 6182–6.
35. *Lee D.H., Kim S.W., Suh C. et al.* Belotecan, new camptothecin analogue, is active in patients with small-cell lung cancer: results of a multicenter early phase II study // Ann. Oncol. – 2008. – Vol. 19. – P. 123–7.
36. *Lee J.E., Park H.S., Jung S.S. et al.* Phase II study of a 3-week schedule of irinotecan combined with cisplatin in previously untreated extensive-stage small-cell lung cancer // Oncology. – 2007. – Vol. 73. – P. 76–80.
37. *Lee S.M., James L., Buchler T. et al.* Phase II trial of thalidomide with chemotherapy and as maintenance therapy for patients with poor prognosis small-cell lung cancer // Lung Cancer. – 2008. – Vol. 59. – P. 364–8.
38. *Loehrer P.J.S., Ansari R., Gonin R. et al.* Cisplatin plus etoposide with and without ifosfamide in extensive small-cell lung cancer // J. Clin. Oncol. – 1995. – Vol. 13. – P. 2594–9.
39. *Lynch T.J., Herndon J.E., Lyss A.P. et al.* Paclitaxel+topotecan for previously untreated extensive small-cell lung cancer // Program. and abstracts of the American Society of Clinical Oncology 36th Annual Meeting. – 2000. – Abstr. 1922.
40. *Mavroudis D., Papadakis E., Veslemes M. et al.* A multicenter randomized Clinical trial comparing paclitaxel-etoposide versus cisplatin-etoposide as first-line treatment in patients with small-cell lung cancer // Ann. Oncol. – 2001. – Vol. 12. – P. 463–70.
41. *Mok T.S., Wong H., Zee B. et al.* A phase I-II study of sequential administration of topotecan and oral etoposide in the treatment of patients with small cell lung carcinoma // Cancer. – 2002. – Vol. 95. – P. 1511–9.
42. *Molina J.R., Jett J.R., Foster N. et al.* Phase II trial of oral topotecan and paclitaxel with G-CSF support in patients with previously untreated extensive-stage small-cell lung cancer // Am. J. Clin. Oncol. – 2006. – Vol. 29. – P. 246–51.
43. *Moore A.M., Einhorn L.H., Estes D. et al.* Gefitinib in patients with chemo-sensitive and chemo-refractory relapsed small-cell cancers: phase II trial // Lung Cancer. – 2006. – Vol. 53. – P. 255.
44. *Murray N., Livingston R.B., Shepherd F.A. et al.* Randomized study of CODE versus alternating CAV/EP for extensive-stage small-cell lung cancer // J. Clin. Oncol. – 1999. – Vol. 18. – P. 2300–8.
45. *Naka N., Kawahara M., Okishio K. et al.* Phase II study of weekly irinotecan and carboplatin for refractory or relapsed small-cell cancer // Lung Cancer. – 2002. – Vol. 37. – P. 319–23.
46. *Natale R.B., Lara P.N., Chansky K. et al.* A randomized phase III trial comparing irinotecan/cisplatin with etoposide/cisplatin in patients with previously untreated extensive-stage small-cell lung cancer // Program. and abstracts of the American Society of Clinical Oncology 44th Annual Meeting. – 2008. – Abstr. 7512.
47. *Niell H.B., Herndon J.E., Miller A.A. et al.* Randomized phase III intergroup trial of etoposide and cisplatin with or without paclitaxel and granulocyte colony-stimulating factor in patients with extensive stage small cell lung cancer: Cancer and Leukemia Group B Trial 9732 // J. Clin. Oncol. – 2005. – Vol. 23(16). – P. 3752–9.
48. *Nokihara H., Yano S., Nishioka Y. et al.* A new quinoline derivative MS-209 reverses multidrug resistance and inhibits multiorgan metastases by P-glycoprotein-expressing human small-cell lung cancer lines // Jpn. J. Cancer Res. – 2001. – Vol. 92. – P. 785–92.

Литература (окончание)

49. *Ohe Y., Negoro S., Matsui K. et al.* Phase I-II study of Amrubicin and cisplatin in previously untreated patients with extensive-stage small-cell lung cancer // *Ann. Oncol.* – 2005. – Vol. 16. – P. 430–6.
50. *Okamoto H., Watanabe K., Kunikane H. et al.* Randomized phase III trial of carboplatin plus etoposide vs split doses of cisplatin plus etoposide in elderly or poor-risk patients with extensive-stage small-cell lung cancer // *Br. J. Cancer.* – 2007. – Vol. 97. – P. 162–9.
51. *Oshita F., Saito H., Yamada K.* Dose escalation study of Amrubicin in combination with fixed-dose irinotecan in patients with extensive small-cell lung cancer // *Oncology.* – 2008. – Vol. 74. – P. 7–11.
52. *Pectasides D., Samantas E., Fountzilas G. et al.* Combination chemotherapy with cisplatin, etoposide and irinotecan in patients with extensive small-cell lung cancer: a phase II study of the Hellenic Co-operative Oncology Group // *Lung Cancer.* – 2007. – Vol. 58(3). – P. 355–61.
53. *Perez E.A., Geoffroy F.J., Hillman S. et al.* Phase II study of oral etoposide and intravenous paclitaxel in extensive-stage small-cell lung cancer // *Lung Cancer.* – 2004. – Vol. 44. – P. 347–53.
54. *Pujol J.L., Carestia L., Daures J.P.* Is there a case for cisplatin in the treatment of small cell lung cancer? A meta-analysis of randomized trials of a cisplatin-containing regimen vs a regimen without this alkylating agent // *Br. J. Cancer.* – 2000. – Vol. 83. – P. 8–15.
55. *Pujol J.L., Daures J.P., Riviere A. et al.* Etoposide plus cisplatin with or without the combination of 4'-epidoxorubicin plus cyclophosphamide in treatment of extensive small cell lung cancer: a French Federation of Cancer Institutes multicenter phase III randomized study // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2001. – Vol. 93(4). – P.300–8.
56. *Ramalinam S., Belani C.P., Day R. et al.* Phase II study of topotecan and paclitaxel for patients with previously untreated extensive stage small-cell lung cancer // *Ann. Oncol.* – 2004. – Vol. 15. – P. 247–51.
57. *Rapti A., Agelidou A., Stergiou I. et al.* Combination of vinorelbine plus gemcitabine in previously treated patients with small cell lung cancer: a multicentre phase II study // *Lung Cancer.* – 2005. – Vol. 49. – P. 241–4.
58. *Reck M., Groth G., Buchholz E. et al.* Topotecan and etoposide as first-line therapy for extensive disease small-cell lung cancer: a phase II trial of a platinum-free regimen // *Lung Cancer.* – 2005. – Vol. 48. – P. 409–13.
59. *Rocha-Lima C.M., Herndon J.E., Lee M.E. et al.* Phase II trial of irinotecan/gemcitabine as second-line therapy for relapsed and refractory small-cell lung cancer // *Ann. Oncol.* – 2007. – Vol. 18. – P. 331–7.
60. *Rudin C.M., Salgia R., Wang X. et al.* Randomized phase II study of carboplatin and etoposide with or without the bcl-2 antisense oligonucleotide oblimersen for extensive-stage small-cell lung cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 26. – P. 870–6.
61. *Schmitt A., Knodler M., Hortig P. et al.* Phase II trial of second-line bendamustine chemotherapy in relapsed small-cell lung cancer // *Lung Cancer.* – 2007. – Vol. 55. – P. 109–13.
62. *Schuette W., Nagel S., Juergens S. et al.* Phase II trial of gemcitabine/irinotecan in refractory or relapsed small-cell lung cancer // *Clin. Lung Cancer.* – 2005. – Vol. 7. – P. 133–7.
63. *Sculier J.P., Lafitte J.J., Lecomte J. et al.* A phase II randomized trial comparing the cisplatin-etoposide combination chemotherapy with or without carboplatin as second-line therapy for small-cell lung cancer // *Ann. Oncol.* – 2002. – Vol. 13. – P. 1454–9.
64. *Seifart U., Fink T., Schade-Brittinger C. et al.* Randomized phase II study comparing topotecan/carboplatin administration for 5 versus 3 days in the treatment of extensive-stage small-cell lung cancer // *Ann. Oncol.* – 2007. – Vol. 18. – P. 104–9.
65. *Sekine I., Nishiwaki Y., Noda K. et al.* Randomized phase II study of cisplatin, irinotecan and etoposide combinations administered weekly or every 4 weeks for extensive small-cell lung cancer // *Ann. Oncol.* – 2003. – Vol. 14. – P. 709–14.
66. *Sessa C., Wanders J., Roelvink M. et al.* Second-line treatment of small-cell lung cancer with the camptothecin-derivative GI147211 // *Ann. Oncol.* – 2000. – Vol. 11. – P. 207–10.
67. *Shepherd F., Giaccone G., Seymour L. et al.* Prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of marimastat after response to first-line chemotherapy in patients with small-cell lung cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2002. – Vol. 21. – P. 4434–9.
68. *Socinski M.A., Neubauer M.A., Olivares J. et al.* Phase II trial of paclitaxel, ifosfamide and carboplatin in extensive-stage small-cell lung cancer // *Lung Cancer.* – 2003. – Vol. 40. – P. 91–7.
69. *Socinski M.A., Weissman C., Hart L.L. et al.* Randomized phase II trial of pemetrexed combined with either cisplatin or carboplatin in untreated extensive-stage small-cell lung cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 4840–7.
70. *Sohn J.H., Choi H.J., Chang J. et al.* A phase II trial of fractionated irinotecan plus carboplatin for previously untreated extensive-disease small-cell lung cancer // *Lung Cancer.* – 2006. – Vol. 54. – P. 365–70.
71. *Spigel D.R., Hainsworth J.D., Simons L. et al.* Irinotecan, carboplatin, and imatinib in untreated extensive-stage small-cell lung cancer: a phase II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network // *J. Thorac. Oncol.* – 2007. – Vol. 2(9). – P. 854–61.
72. *Stathopoulos G.P., Christodoulou Ch., Stathopoulos J. et al.* Second-line chemotherapy in small-cell lung cancer in a modified administration of topotecan combined with paclitaxel: a phase II study // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 57. – P. 796–800.
73. *Tabata M., Kiura K., Okimoto N. et al.* A phase II trial of cisplatin and irinotecan alternating with doxorubicin, cyclophosphamide and etoposide in previously untreated patients with extensive-disease small-cell lung cancer // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 60. – P. 1–6.
74. *Tas F., Derin D., Guney N. et al.* Addition of topotecan to standard cisplatin/etoposide combination in patients with extended stage small-cell lung carcinoma // *Lung Cancer.* – 2007. – Vol. 57. – P. 79–83.
75. *Unsal M., Erturk D.* Cisplatin and etoposide alternating ifosfamide, vincristine, epirubicin in small-cell lung cancer // *Saudi Med. J.* – 2003. – Vol. 24. – P. 628–31.
76. *Urban T., Chastang C., Lebas F.X. et al.* The addition of cisplatin to cyclophosphamide-doxorubicin-etoposide combination chemotherapy in the treatment of patients with small-cell lung carcinoma // *Cancer.* – 1999. – Vol. 86. – P. 2238–45.
77. *Vansteenkiste J., Gatzemeier U., Manegold C. et al.* Gemcitabine plus etoposide in chemonaive extensive disease small-cell lung cancer: a multicenter phase II study // *Ann. Oncol.* – 2001. – Vol. 12. – P. 835–40.
78. *Yu N.Y., Conway C., Pena R.L. et al.* Stealth liposomal CKD-602, a topoisomerase I inhibitor, improves the therapeutic index in human tumor xenograft models // *Anticancer Res.* – 2007. – Vol. 27. – P. 2541–5.

УДК 616.24-006.6-092.9:615.277.3

Н.А. Лесная, В.С. Покровский, В.И. Романенко, Е.М. Трещалина

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ПЕРЕНОСИМОСТЬ КОМБИНАЦИЙ С ВКЛЮЧЕНИЕМ ЭТОПОЗИДА, ЦИСПЛАТИНА И АРАНОЗЫ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЭПИДЕРМОИДНОЙ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЛЬЮИС У МЫШЕЙ

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация:

Лесная Нина Александровна, старший научный сотрудник лаборатории комбинированных методов исследования НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей.

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(499)611-85-48**e-mail:** vadimpokrovsky@yandex.ru

Статья поступила: 22.12.2008 г., принята к печати: 23.09.2009 г.

Резюме

В работе представлены результаты доклинического изучения комбинации этопозид+цисплатин+араноза (etoposide+platidiam+aranoza, *EPAr*) на мышцах-самцах BDF₁ с подкожно или внутримышечно трансплантированной эпидермоидной карциномой легкого Льюис (Lewis lung carcinoma, LLC). Использована схема этопозид 5–15 мг/кг, цисплатин 2–3 мг/кг, араноза 100–200 мг/кг. Препараты вводили ежедневно внутривентрально последовательно в течение 3-х дней. Показан значимый синергизм комбинантов в комбинации *EPAr* при удовлетворительной переносимости лечения. Комбинация *EPAr* в сравнении со стандартной схемой полихимиотерапии мелкоклеточного рака легкого этопозид+цисплатин (*EP*) достоверно более эффективна и не приводит к повышению риска гематологической токсичности.

Ключевые слова: полихимиотерапия, карцинома легкого Льюис, этопозид, цисплатин, араноза.

N.A. Lesnaya, V.S. Pokrovsky, V.I. Romanenko, H.M. Treshalina

EFFICACY AND TOLERANCE OF TRIPLE COMBINATION WITH ETOPOSIDE, CISPLATIN AND ARANOZA ON MICE WITH LEWIS LUNG CARCINOMA

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

Abstract

Promising new anticancer cytostatics of nitro urea derivative Aranoza was administered simultaneously with Cisplatin and Etoposide to BDF₁ mice bearing s.c. or i.m. LLC. Etoposide 5–15 mg/kg, Cisplatin 2–3 mg/kg and Aranoza 100–200 mg/kg were given i.p. As the significant synergism of *EPAr* combination has been demonstrated recovery in mice bearing s.c. or i.m. LLC. The therapeutic efficacy and tolerance of triple combined therapy with *EPAr* in comparison with standard double combination *EP* were evaluated. The high risk of hematological toxicity does not expecting.

Key words: combined chemotherapy, Lewis Lung carcinoma, Etoposide, Cisplatin, Aranoza.**Введение**

Полихимиотерапия является основным методом лечения мелкоклеточного рака легкого и диссеминированного НМРЛ. Эффективность современных схем ПХТ достигает 70–80% при МРЛ и только 20–30% при НМРЛ. Однако высокая частота объективных эффектов не приводит к улучшению отдаленных результатов лечения МРЛ вследствие метастазирования и частых рецидивов опухоли. Поэтому разработка новых схем ПХТ рака легкого актуальна. Основу ПХТ как МРЛ, так и НМРЛ составляют комбинации с включением препаратов платины (цисплатин, карбоплатин). Так, «золотым стандартом» лечения МРЛ в конце 1990-х гг. была признана комбинация *EP*. Большинство новых режимов ПХТ разрабатывают на основе *EP*: либо заменяют этопозид, либо добавляют другие препараты. Так, в Японии на 1-й линии лечения МРЛ применяют комбинацию *IP* [9–11].

В отделении ХТ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН была разработана тройная комбинация нимустин + этопозид + цисплатин, показавшая выраженную противоопухолевую активность при МРЛ. Авторы

особо отмечают активность *AVP* при метастазах в головной мозг. Недостатки *AVP* связаны с характерной для производных нитрозомочевин отсроченной кумулятивной миелосупрессией и необходимостью длительного контроля кроветворной функции [6].

Один из путей минимизации указанного недостатка схемы *AVP* – замена нимустина отечественным нитропроизводным аранозой, которая сравнительно меньше нарушает кроветворение и не имеет отсроченной токсичности. Кроме того, араноза обладает большим диапазоном терапевтических доз и эффективна в комбинациях с комплексными соединениями платины и другими противоопухолевыми препаратами [3; 5]. При доклиническом изучении на моделях лейкозов и солидных опухолей мышей была показана высокая эффективность аранозы в отношении лимфолейкозов L1210, P388, а также солидных опухолей B16, Ca755, АКАТОЛ, сарком 37 и 180, LLC и др. [4].

Араноза также оказалась эффективной на гетеротрансплантатах различных опухолей человека у бестимусных мышей и крыс, в том числе на лимфоме Беркитта P3HR1, меланоме Me Wo, саркоме Юинга и НМРЛ [1].

В рамках клинических исследований у больных МРЛ в качестве 2-й линии лечения была изучена комбинация аранозы с доксорубицином и винкристином. Было показано, что *ArDV* не уступает по эффективности наиболее распространенным схемам лечения, в частности, монотерапии топотеканом (эффективность 23%, медиана продолжительности жизни – 7 мес) и имеет более благоприятный профиль токсичности. Комбинация *ArDV* оказалась высокоэффективной при метастазах в головной мозг. Токсичность проявлялась в основном кратковременной анемией, лейкопенией и тромбоцитопенией I–II степеней [2].

Таким образом, включение аранозы в схемы ПХТ рака легкого представляется перспективным. Для обоснования клинического изучения новых схем с аранозой необходима оценка эффективности и переносимости комбинаций в эксперименте.

Цель исследования

Доклиническое изучение эффективности и переносимости комбинации *EPAr*.

Задачи исследования

1. Определение эффективных и переносимых доз препаратов в эксперименте на модели рака легкого;
2. Разработка рационального дозового режима применения комбинации *EPAr in vivo*.

Материалы и методы

Животные

В опытах использовали мышей-самцов – гибридных BDF₁ и линейных C₅₇Bl – массой тела не менее 18 г из разведения РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Животных содержали в виварии отдела лабораторных животных РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН с естественным освещением на брикетированном корме и постоянном доступе к воде. Перед лечением мышей распределяли на группы (n=6–14). Одну группу оставляли без специфического лечения и считали контрольной (n=10–12).

Модель опухоли

Использована метастазирующая в легкие эпидермоидная карцинома легкого Льюис 2–15 пассажи *in vivo*. Опухоль трансплантировали мышам взвесью клеток в питательной среде 199 п/к или в/м по стандартной методике, принятой в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН [7; 8].

Препараты

Все препараты вводили в/б ежедневно на 2–4 сут после п/к трансплантации или на 7–10 (10–12) сут после в/м трансплантации опухоли. Этопозид (*E*) и цисплатин (*P*) вводили в 0,9% растворе натрия хлорида, аранозу (*Ar*) – в 5% растворе глюкозы.

Ar лиофилизированная (производство «Глес», РФ) во флаконах по 500 мг. 1% раствор *Ar* вводили мышам в/б в разовых дозах 50–200 мг/кг.

E инъекционный раствор (производство «Teva», Нидерланды) во флаконах по 5 мл, содержащих по 100 мг препарата. 0,1% раствор *E* вводили мышам в/б в разовых дозах 2,5–15 мг/кг.

P инъекционный раствор (производство «Ebeve», Польша) во флаконах по 20 мл, содержащих по 10 мг препарата. 0,025% раствор *P* вводили мышам в/б в разовых дозах 2,5–3,0 мг/кг.

В группах комбинированного лечения препараты вводили в последовательности: *E–P–Ar* с интервалом 10–20 мин.

Оценка противоопухолевого эффекта

Эффективность лечения мышей с LLC оценивали по стандартным критериям: торможению роста опухоли, увеличению продолжительности жизни и излечению животных. Значимыми считали ТРО_{≥50} %, УПЖ_{≥25} %. Излеченными считали животных, у которых в течение 60–90 дней опухоль не определялась. Показатели эффективности определяли в сравнении с контрольными группами мышей.

Основными характеристиками эффективности тройной комбинации *EPAr* были выбраны отсроченные эффекты лечения, позволяющие достоверно оценить эффективность, – УПЖ и излечение мышей с метастазирующей в легкие опухолью. Период лечения (2–4 дни после трансплантации опухоли) соответствовал началу метастазирования.

Оценка переносимости

О переносимости воздействия судили по состоянию и поведению животных, достоверному уменьшению массы тела (≥30 %) и селезенки (косвенные признаки общей и гематологической токсичности), а также по ожидаемой гибели от токсичности. Павших или умерщвленных в конце опыта мышей подвергали аутопсии для визуального определения патологических изменений внутренних органов.

Статистическая обработка

Полученные данные подвергали статистической обработке по методу Фишера-Стьюдента в модификации Р.Б. Стрелкова, рассчитывая доверительные интервалы средних сравниваемых величин. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Для проведения ПХТ предварительно определили диапазон эффективных и переносимых доз каждого из препаратов на мышах с п/к LLC. Использованы одна или 2 разовые дозы вплоть до максимально переносимых (МПД) при 3-дневном курсе лечения. Эффективными считали дозы, приводящие на 5–15-е сутки после окончания лечения к ТРО_{≥50}%.

Полученные данные представлены в табл. 1. Видно, что эффективность *Ar* и *P* была практически одинаковой, ТРОмах составило 83 и 85% соответственно. Эффективность *E* была меньше и даже при максимальной дозе 15 мг/кг не достигла уровня *Ar* и *P*, ТРОмах составило 70%.

При *Ar* и *P* эффективность монотерапии удерживалась на минимально значимом уровне ТРО=50–60% только до 14-го дня. Продолжительность жизни мышей при этом достоверно возрастала до УПЖ=37% ($p < 0,05$) лишь при монотерапии *P*. При использовании *Ar* или *E* отдаленный эффект практически не отличался от контроля, УПЖ=6–16% ($p < 0,05$), излечения не наблюдали.

Переносимость всех видов лечения была удовлетворительной, масса тела мышей при применении каждого из препаратов практически не снижалась: уменьшение на 8–11% отмечали только при применении высоких доз *Ar* или *E* ($p < 0,05$). Соответственно кумулятивное уменьшение массы тела мышей не прогнозировали. Уменьшение средней массы селезенки по отношению к контролю на 31–38% ($p < 0,05$) отмечали во всех случаях, кроме *E* в дозе 5 мг/кг.

Таким образом, *Ar*, *P* или *E* в монотерапии даже при применении доз, близких к МПД, давали кратковременный противоопухолевый эффект в отношении первичного опухолевого узла без существенного продления жизни (исключая *P*) и без излечения мышей. Учитывая косвенный признак гематологической токсичности – достоверное уменьшение массы селезенки, можно ожидать повышения токсичности при сочетании всех 3 препаратов. Как следует из вышеизложенного, при комбинированном лечении были дополнительно использованы меньшие разовые дозы *P* – 2,5 мг/кг, *Ar* – 50 и 75 мг/кг. В данной серии экспериментов препараты вводили одновременно последовательно с целью выявления максимальных биологических эффектов и совместимости препаратов.

Эффективность *EP*, *EAr*, *PAr*

Количественная оценка синергизма тройной комбинации требует знания не только эффективности монотерапии, но и двойных сочетаний препаратов. Для получения этих данных изучена эффективность комбинаций *EP*, *EAr*, *PAr* на п/к LLC.

Применение *EP* показало (табл. 2), что эта схема высокоэффективна и проявляет противоопухолевое действие на п/к LLC в прямой зависимости от дозы *E*. Эта зависимость хорошо прослеживалась на 14-е сутки после окончания лечения, когда увеличение дозы *E* в интервале от 5 до 10 и 15 мг/кг давало пропорциональное увеличение ТРО в 1,3–1,5 раза, т.е. до 56; 75 и 85%, соответственно. Несмотря на то, что даже при максимальной из изученных доз *E* 15 мг/кг излечения мышей добиться не удалось, продолжительность жизни мышей в этой группе достоверно возросла, УПЖ=66% ($p<0,05$). В легких всех павших от опухоли мышей контрольной и подопытных групп обнаружены метастазы, визуальных различий в степени поражения легких не выявлено.

Переносимость всех схем по состоянию и поведению мышей была удовлетворительной. В результате аутопсии павших от опухоли мышей каких-либо патологических изменений внутренних органов не наблюдали, кроме достоверного уменьшения массы селезенки на 40% при применении *E* в относительно высокой разовой дозе 15 мг/кг. При увеличении противоопухолевого эффекта схемы *EP* с возрастанием дозы *E* от 5 до 15 мг/кг средняя масса селезенки мышей достоверно уменьшалась в 2,2–2,7 раз.

Таким образом, результаты изучения чувствительности п/к LLC к стандартной схеме *EP* показали, что эта схема эффективна, но не приводит к полному эффекту (излечению) даже при применении близкой к МПД дозы *E*. Следовательно, модель пригодна для оценки возможности усиления ответа на комбинированное лечение путем добавления третьего препарата, *Ar*. Данные об увеличении риска гематологической токсичности при применении высоких доз *E* послужили основанием для использования *E* в дозе 5 мг/кг при изучении тройной комбинации *EPAr*.

Наиболее эффективной из двойных комбинаций оказалась *PAr* при разовых дозах *P* 2,5 мг/кг и *Ar* 100 и 150 мг/кг. Сразу после окончания лечения в обеих группах опухоли не определялись, ТРО=100 %. К 22-м суткам у 10–30% животных опухоли также не определялись, а у остальных животных рост опухоли был существенно ингибирован, независимо от дозы *Ar*. Соответственно, общий ингибирующий эффект лечения к этому сроку в группах составил 89–93% ($p<0,05\%$). Отсутствие

опухоли у мышей прослежено до 90 сут, в результате констатировано излечение 10–30% животных. Указанный уровень эффективности *PAr* был существенно выше эффекта монотерапии каждым препаратом по всем использованным критериям. В легких всех павших от опухоли мышей контрольной и подопытных групп обнаружены метастазы. В легких мышей без опухоли метастазов не обнаружено.

Состояние мышей во всех случаях сочетания *P* и *Ar* было удовлетворительным. Результаты аутопсии павших от опухоли или умерщвленных на 93 сутки наблюдения мышей показали отсутствие видимых изменений внутренних органов, за исключением достоверного уменьшения массы селезенки на 51–57% ($p<0,05$).

Таким образом, результаты лечения *PAr* соответствуют известным данным о высокой эффективности этой схемы в эксперименте и клинике. Для тройной комбинации выбраны различные дозовые режимы, поскольку достоверных различий в эффективности и переносимости не выявлено.

Комбинация *EAr* оказалась сходной с комбинацией *EP* как по эффективности, так и по переносимости. При применении *E* в разовой дозе 5 мг/кг и *Ar* в разовой дозе 150 мг/кг на 6–22-е сутки после окончания лечения ТРО = 89 и 26% соответственно. УПЖ=7%, излечение не наступило.

Переносимость лечения была удовлетворительной: уменьшение массы селезенки по сравнению с животными контрольной группой составило 33% (различия недостоверны), видимых патологических изменений внутренних органов при аутопсии не отмечено.

Таким образом, полученные данные позволяют предполагать синергизм *EPAr* за счет всех использованных препаратов или их сочетаний. Коррекция доз препаратов в тройной комбинации, обеспечивающая меньший риск гематологической токсичности, целесообразна только для *E*.

Эффективность комбинации *EPAr*

Для изучения эффективности *EPAr* использовали переносимые ранее разовые дозы препаратов: *E* 5–10 мг/кг, *P* 2,5 и 3,0 мг/кг, *Ar* 50–200 мг/кг. Для выявления синергизма *EPAr* на п/к LLC сравнивали эффективность препаратов в монотерапии и комбинированного лечения при терапевтических дозах.

Результаты

Таблица 4 показывает потенцирование эффекта комбинированного лечения вплоть до полного излечения мышей, особенно в сравнении с монотерапией, которая приводила только к ТРО или незначительному УПЖ мышей.

Переносимость тройной комбинации была удовлетворительной. Среди побочных эффектов отмечено только достоверное уменьшение массы селезенки до 67 [57–75] мг ($p<0,05$) в сравнении, как с контрольной группой, так и с группами монотерапии. Это свидетельствует о возможности проявления гематологической токсичности. Других побочных эффектов не выявлено; видимых патологических изменений внутренних органов при аутопсии не отмечено. Эффективность *EPAr* в сравнении с *EP* была изучена на п/к LLC. Показано (табл. 5), что применение *EPAr* приводит к полному излечению мышей. Этот эффект получен при высоких терапевтических дозах *Ar* и *P* и относительно невысокой дозе разовой дозы *E* 5 мг/кг. При дозах *Ar* в комбинации от 50 до 200 мг/кг достигалось излечение 43–100% мышей.

Таблица 1

Эффективность и переносимость монотерапии *E*, *P* или *Ar*

Препарат	РД, мг/кг	Лечение					
		Эффективность			Переносимость		
		ТРО/сутки после лечения, %			УПЖ, %	Уменьшение массы тела на 5-е сутки после лечения, %	Снижение массы селезенки, %
		6	14	22			
<i>E</i>	5	57*	31	22	15	2	9
	15	70*	40	35*	11	11	37*
<i>P</i>	3	85*	61*	51*	37*	5	31*
<i>Ar</i>	100	83*	58*	46*	16	6	37*
	200	74*	53*	38*	6	8	38

*Достоверно по отношению к контролю, $p < 0,05$

Таблица 2

Чувствительность п/к LLC к схеме *EP*

Препарат	РД, мг/кг	п мышей	ТРО/сутки после лечения, %			УПЖ, %	m _{ср} селезенки, мг
			6	14	22		
<i>E</i> <i>P</i>	5 2,5	10	88*	56*	42*	2	301 [231÷371]
<i>E</i> <i>P</i>	10 2,5	7	99*	75*	67*	30	134** [91÷177]
<i>E</i> <i>P</i>	15 2,5	8	100*	85*	67*	66**	110** [94÷126]

*Достоверно по отношению к контролю, $p < 0,05$;**достоверно по отношению к контролю и к *EP* с дозой *E* 5 мг/кг, $p < 0,05$

Таблица 3

Эффективность *PAr* и *EAr* при п/к LLC

Препарат	РД, мг/кг	п мышей	ТРО/сутки после лечения, %			Излечение, %	УПЖ, %	↓ m селезенки, %
			6	14	22			
<i>P</i> <i>Ar</i>	2,5 100	10	100*	99*	93*	30	23	51*
<i>P</i> <i>Ar</i>	2,5 150	10	100*	98*	89*	10	29	57*
<i>E</i> <i>Ar</i>	5 150	10	89*	51*	26*	0	7	33

*Достоверно по отношению к контролю, $p < 0,05$

Таблица 4

Сравнительная эффективность *EPAr* и монотерапии на п/к LLC

Препарат	РД, мг/кг	п мышей	УПЖ, %	Излечение, %	↓ m селезенки, %
<i>E</i>	5	10	15	0	9
<i>P</i>	3	10	37*	0	31*
<i>Ar</i>	200	10	6	0	38
<i>E</i> <i>P</i> <i>Ar</i>	5 3 200	11	—	100	76**

*Достоверно по отношению к контролю, $p < 0,05$;**достоверно по отношению к контролю и монотерапии, $p < 0,05$

Таблица 5

Сравнительная эффективность *EPAr* и *EP* на мышах с п/к LLC

Препарат	РД, мг/кг	n мышей	УПЖ, %	Излечение, %	m _{ср} селезенки, мг
<i>E</i> <i>P</i>	5 2,5	10	2	0	301 [231÷371]
	10 2,5	7	30	0	134 [91÷177]
	15 2,5	8	66*	0	110* [94÷126]
<i>E</i> <i>P</i> <i>Ar</i>	2,5 2,5 100	8	–	88	133* [77÷189]
	10 2,5 100	7	–	100	103* [78÷128]
	5 2,5 50	7	–	100	140* [100÷180]
	5 2,5 75	8	–	100	115* [93÷137]
	5 2,5 100	21	–	86	127* [107÷147]
	5 2,5 150	14	52*	43	101* [69÷133]
	5 3 200	19	–	100	77* [59÷95]

Таблица 6

Эффективность *EPAr* при в/м LLC

Препарат	Дозы	Сутки терапии	ТРО/сутки после окончания лечения, %			m _{ср} селезенки, мг
			5–6	12–13	16–17	
<i>E</i> <i>P</i> <i>Ar</i>	5 3 150	8; 9; 10	83*	84*	69*	170 [44÷296]
<i>E</i> <i>P</i> <i>Ar</i>	5 2,5 150	10; 11; 12	84*	55*	48*	232 [254÷396]

*Достоверно по отношению к контролю, p 0,05

Таблица 7

Переносимость *EPAr* в зависимости от доз *E* и *Ar*

РД, мг/кг			m _{ср} тела/сутки после окончания лечения, г				↓ m _{ср} селезенки, %
<i>E</i>	<i>P</i>	<i>Ar</i>	0	6	14	26	
10	2,5	100	24,0	18,2	20,7	23,1	61*
5	2,5	100	23,4	18,0	21,7	24,1	63*
2,5	2,5	100	22,2	17,7	21,5	23,6	50*
5	2,5	75	22,7	17,2	20,0	23,1	57*
5	2,5	50	22,7	19,5	22,9	23,1	47*

*Достоверно по отношению к контролю, p<0,05

Эти данные подтверждают одну из важных характеристик *Ar* – широкий диапазон терапевтических доз, а также благоприятный профиль токсичности. Выявленные свойства определяют эффективность и относительно низкую токсичность комбинаций *Ar* с комплексными соединениями платины, а также другими цитостатиками [3–5].

Большая терапевтическая широта, скорее всего, связана с более мягким действием *Ar* на кроветворение и иммунную систему мышей по сравнению с другими производными нитрозомочевины.

Переносимость всех видов воздействия удовлетворительная.

Ни в одной группе не было отмечено гибели мышей от токсичности или выраженных побочных явлений после проведенного лечения.

Результаты комбинированной терапии по схеме *EPAr* развившейся в/м LLC мышей представлены в табл. 6.

На 5–13-е сутки после окончания лечения наблюдалось достоверное ТРО=84–55% ($p < 0,05$), сохранявшееся на протяжении 20 дней.

Однако значимого УПЖ при применении препаратов в указанных дозах не наблюдалось.

Переносимость *EPAr* сопоставима с переносимостью двойных комбинаций или монотерапии: гибели животных от токсичности не отмечалось, однако средняя масса селезенки была меньше, чем при двойных комбинациях.

Уменьшение массы тела через 3–7 дней после окончания лечения составило не более 25%. Восстановление показателя наблюдали к 14–26-м суткам после окончания лечения (табл. 7).

Ухудшение переносимости *EPAr* связано с дозовым режимом препаратов.

Литература

1. Бухарова И.К., Ревазова Е.С., Мороз Л.В. Чувствительность к аранозе некоторых гетеротрансплантатов опухолей человека у бестимусных мышей и крыс // Химиотерапия опухолей в СССР. – 1986 г. – вып. 45. – С. 164–167.
2. Кузьминов А.Е. Разработка новых режимов комбинированной химиотерапии диссеминированного мелкоклеточного рака легкого. Авторефер. дис... канд. мед. наук. – М., 2007. – 28 с.
3. Манзюк Л.В., Бородкина А.Г., Артамонова Е.В. и др. Опыт применения лекарственных комбинаций на основе аранозы в лечении диссеминированной меланомы кожи // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2000. – № 2. – С. 27–30.
4. Муханов В.И., Платонова Г.Н., Перетолчина Н.М. и др. Новый противоопухолевый препарат араноза // Химиотерапия опухолей в СССР. – 1980. – вып. 32. – С. 133–9.
5. Перетолчина Н.М., Ключкова Т.И., Михайлова Л.М., Бородкина А.Г. Араноза – новый противоопухолевый препарат. – М.: РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2000. – 36 с.
6. Семин О.В. Новые производные нитрозомочевины в лечении мелкоклеточного рака легкого. Авторефер. дис... канд. мед. наук. – М., 2003 г. – 27 с.
7. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. – В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под общей ред. Р.У. Хабриева. – 2 изд. – М., Медицина, 2005. – С. 637–51.
8. Chabner B.A., Longo D.L. Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice. – 3rd ed., Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001. – P. 678–99.
9. Eckardt J.R., von Pawel J., Papai Z. et al. Open-label, multicenter, randomized, phase III study comparing oral topotecan/cisplatin versus etoposide/cisplatin as treatment for chemotherapy-naïve patients with extensive-disease small-cell lung cancer // J. Clin. Oncol. – 2006. – Vol. 24. – P. 2044–51.
10. Hanna N., Bunn P.A., Langer C. et al. Randomized phase III trial comparing irinotecan/cisplatin with etoposide/cisplatin in patients with previously untreated extensive-stage disease small cell lung cancer // J. Clin. Oncol. – 2006. – Vol. 24(13). – P. 203843.
11. Ohe Y., Negoro S., Matsui K. et al. Phase I-II study of amrubicin and cisplatin in previously untreated patients with extensive-stage small-cell lung cancer // Ann. Oncol. – 2005. – Vol. 16. – P. 430–6.
12. Zupi G., Greco C., Sacchi A., Calabresi F. Etoposide prior to cis-Diamminedichloroplatinum in combination chemotherapy: in vitro and in vivo studies // Eur. J. Cancer. Clin. Oncol. – 1985. – Vol. 21. – P. 1501–6.

Обсуждение

В работе изучена возможность повышения эффективности стандартной ПХТ по схеме *EP* [9; 10] с включением *Ar* на модели рака легкого LLC. В результате проведенного исследования установлена высокая эффективность комбинации *EPAr* при лечении опухоли на ранней и поздней стадиях развития. В реализации противоопухолевого эффекта *EPAr* основную роль играет сочетание *PAr*. Переносимость тройной комбинации сравнима с таковой для монотерапии или двойных комбинаций. Основным ожидаемым побочным эффектом – гематологическая токсичность, которая может быть снижена уменьшением доз *Ar/E* без потери эффективности. Эффективность *EPAr* проявляется существенным ингибированием роста опухоли и излечением мышей с LLC вплоть до полного, в отличие от *EP*, применение которой к излечению не приводит [12].

Полученные данные позволяют надеяться, что комбинация *EPAr* может найти клиническое применение при лечении МРЛ.

Выводы

1. Трехдневный курс лечения по схеме этопозид + цисплатин + араноза приводит к излечению мышей с метастазирующей в легкие эпидермоидной LLC.
2. Тройная комбинация *EPAr* по сравнению с двойными комбинациями этопозид + цисплатин, этопозид + араноза и цисплатин + араноза достоверно более эффективна по критерию выживаемости.
3. Переносимость *EPAr* сопоставима с переносимостью двойных комбинаций *PAr*, *EP* и *EA*.
4. Комбинация *EPAr* перспективна для клинического изучения при МРЛ.

УДК 618.19-006.6-037

*А.И. Беришвили, К.П. Лактионов***ПЕРВИЧНАЯ И ВТОРИЧНАЯ ОТЕЧНО-ИНФИЛЬТРАТИВНАЯ ФОРМЫ РМЖ: СХОДСТВО ИЛИ РАЗЛИЧИЯ?**

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация:

Александр Ильич Беришвили, канд. мед. наук, старший научный сотрудник хирургического отделения опухолей женской репродуктивной системы НИИ клинической онкологии.

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(495)324-24-20**e-mail:** aberishvili@yandex.ru

Статья поступила: 04.05.2009 г., принята к печати: 23.09.2009 г.

Резюме

Отечно-инфильтративная форма рака молочной железы характеризуется быстрой опухолевой прогрессией, ранним метастазированием и плохим прогнозом. Комплексное лечение (хирургия, лучевая терапия, гормонотерапия и химиотерапия) является стандартом лечения ОИФ РМЖ, позволяя добиться улучшения выживаемости по сравнению с одно- и двухкомпонентным лечением. В исследование включено 299 больных ОИФ РМЖ: 59 – первичной ОИФ РМЖ, 240 больных – вторичной ОИФ РМЖ. Средний возраст составил 49 и 51 год, отдаленные метастазы имелись у 36 и 35 % пациенток, рецепторнегативный статус опухоли определялся в 65 и 56 % случаев при первичной и вторичной ОИФ РМЖ соответственно. Не выявлено достоверных различий в режимах лечения, безрецидивной выживаемости, составившей 22 и 24 мес., и общей выживаемости, составившей 47 и 39 мес. соответственно. При многофакторном анализе установлено влияние только одного признака – эффекта от лечения. Разделение ОИФ РМЖ на первичную и вторичную не имеет большого прогностического значения.

Ключевые слова: отеочно-инфильтративная форма рака молочной железы, первичная ОИФ РМЖ, вторичная ОИФ РМЖ, прогноз.

*A.I. Berishvili, K.P. Laktionov***PRIMARY AND SECONDARY INFLAMMATORY BREAST CANCER: SIMILAR OR DIFFERENT?**

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

Abstract

Inflammatory breast cancer is characterized by rapid tumor progression, early metastasis, and poor survival. Multimodal therapy (surgery, radiotherapy, endocrine therapy, and chemotherapy) has become the mainstay of treatment for IBC, offering a significant improvement in survival over single-modality or dual-modality treatments. Two hundred ninety nine patients with IBC were enrolled in the study; 59 patients were with primary IBC and 240 – with secondary IBC. The mean age was 49 and 51 year; 36 % and 35 % of women had distant metastasis; 65 % and 56 % were receptor negative in groups with primary and secondary IBC accordingly. No significant difference was found in treatment regimen and median disease-free survival, which was 22 and 24 months and overall survival, which was 47 and 39 months accordingly. Multivariate analysis identified effect on treatment as the only key factor. The distinction between primary and secondary IBC appears to be of little prognostic value.

Key words: inflammatory breast cancer, primary IBC, secondary IBC, prognosis.

Введение

Отечно-инфильтративная форма рака молочной железы является частью местнораспространенного рака молочной железы, встречается в 2,5 случаях на 100 000 женского населения, составляя в США 1–6 % РМЖ [8; 17; 24]. Впервые описана В. Lee и Н. Tannenbaum [27] в 1924 г. Уникальные клинические и морфологические особенности вместе с неблагоприятным прогнозом делают ее особой формой РМЖ, которая характеризуется тремя биологическими особенностями: быстрым ростом опухоли, высокой ангиоинвазивностью и ангиогенностью и, наконец, высоким метастатическим потенциалом, делающим ее наиболее летальной частью МР РМЖ. По данным I. Jaiyesimi et al. [22], большинство пациенток ОИФ РМЖ имели пальпируемые подмышечные лимфатические узлы и уже на момент установления диагноза 30 % – отдаленные метастазы. В ретро-

спективном исследовании L. Curcio et al. [11] 3-летняя общая выживаемость для женщин с ПИВ стадией заболевания составила 41,3 % по сравнению с 12,5 % при IV стадии ($p=0,006$), что свидетельствует о необходимости ранней диагностики. В этом смысле весьма информативна позитронно-эмиссионная томография, позволяющая в большинстве случаев выявить РМЖ на ранних этапах развития, оказывая непосредственное влияние на результаты лечения ОИФ РМЖ [1]. Несмотря на мультимодальное лечение, прогноз данного заболевания остается неблагоприятным, а 3-летняя выживаемость не превышает 30–40 %, тогда как при МР РМЖ она достигает 85 % [8; 10]. Выделяют две разновидности отеочно-инфильтративной формы РМЖ: первичную и вторичную. Клинико-рентгенологически первичная (истинная) форма характеризуется диффузной инфильтрацией ткани молочной железы, отеком кожи, ее гиперемией, а также отсутствием опухолевого узла пальпаторно и на маммограммах.

По мнению S. Giordano et al. [13], быстрый рост опухоли при первичной ОИФ РМЖ является одной из характерных черт, позволяющих отличить ее от местнораспространенного рака со вторичным отеком кожи. Кроме того, как показали С. Kleer et al. [24], при первичной ОИФ РМЖ чаще встречаются инфильтративный протоковый рак, низкая степень дифференцировки и опухолевые клетки с высокой митотической активностью. Для вторичной ОИФ РМЖ характерна большая длительность анамнеза заболевания и наличие опухолевого узла на маммограммах. Так, М. Cristofanilli et al. [10] даже предлагают ввести критерий длительности развития классических признаков заболевания более 3 мес. для выделения пациенток со вторичной ОИФ РМЖ. Отек кожи и инфильтрация тканей молочной железы появляются спустя несколько месяцев после сравнительно медленного роста опухолевого узла. Ангиолимфатическая инвазия опухолевыми клетками часто определяется при ОИФ РМЖ, тогда как инвазия дермы за пределы лимфатических сосудов нехарактерна, что отличает истинную (первичную) ОИФ РМЖ от вторичной [24].

Единства относительно необходимости такого разделения на первичную и вторичную ОИФ РМЖ среди исследователей нет. Так, ряд авторов не находят различий в выживаемости данных категорий больных и считает такое разделение искусственным [20; 34], а другие указывают на биологические различия между ОИФ РМЖ и МР РМЖ с последующим отеком, ставящие ОИФ РМЖ на особое место [6; 14; 24; 25; 35].

Цель исследования – оценка собственного клинического материала по лечению ОИФ РМЖ, накопленного в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН за 15 лет, а также сравнительный анализ клинкоморфологических и биологических характеристик первичной и вторичной отечно-инфильтративной форм рака молочной железы в свете непосредственных и отдаленных результатов их лечения.

Материалы и методы

В исследование вошли данные о 299 больных ОИФ РМЖ, получавших лечение в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН с 1990 по 2005 г. Из них 59 (19,7 %) имели первичную, а 240 (80,3 %) – вторичную ОИФ РМЖ. Клиническая характеристика групп представлена в таблице.

Хирургическое лечение в объеме радикальной мастэктомии выполнялось в 27 (46 %) случаях в группе с первичной и в 129 (54 %) – в группе со вторичной ОИФ РМЖ.

Неoadъювантную химиотерапию получали 277 пациенток, из них 54 (92 %) больные с первичной ОИФ РМЖ и 223 (93 %) – со вторичной.

Гормонотерапию получали 19 (32 %) больных первичной ОИФ РМЖ и 104 (43 %) – вторичной ОИФ РМЖ. Предоперационная лучевая терапия на молочную железу и зону регионарного метастазирования в дозе 50–70 Гр проводилась 32 (54 %) и 130 (54 %) больным с первичной и вторичной ОИФ РМЖ соответственно.

Адъювантную химиотерапию получали 27 (54 %) больных первичной и 108 (45 %) вторичной ОИФ РМЖ.

Послеоперационная лучевая терапия на послеоперационный рубец и зоны регионарного метастазирования проводилась 3 (5 %) и 31 (13 %) больным первичной и вторичной ОИФ РМЖ соответственно.

Оценка эффективности лечения производилась в соответствии с рекомендациями ВОЗ по результатам клинического осмотра (уменьшение отека, гиперемии кожи, плотности тканей железы), маммографического и ультразвукового исследований.

Достоверность различий признаков в сопоставляемых группах оценивали с использованием t-критерия Стьюдента (ДИ не менее 95 %, $p < 0,05$). Показатели выживаемости вычисляли методом построения таблиц дожития по Kaplan-Meier.

Результаты

Разделение ОИФ РМЖ на первичную и вторичную формы (последняя характеризуется наличием опухолевого узла, инвазии лимфатических сосудов дермы и отсутствием клинических признаков диффузной опухолевой инфильтрации тканей МЖ) в настоящий момент четко не классифицируется.

Проведенный нами анализ среднего возраста больных в группах первичной и вторичной ОИФ РМЖ не выявил достоверных различий. Также сходным было и распределение по стадиям заболевания. Следует отметить, что более 90 % женщин имели поражение региональных лимфатических узлов, а 35 % пациенток в обеих группах на момент постановки диагноза уже имели отдаленные метастазы, что свидетельствует об агрессивном течении опухолевого процесса. Метастатическое поражение печени отмечалось в 7 и 14 %, костей – в 22 и 22 %, легких – в 8 и 10 % случаев при первичной и вторичной ОИФ РМЖ соответственно.

По гистологическому строению при вторичной форме инфильтративный протоковый и дольковый рак встречались чаще – 44 и 17 %, чем при первичной ОИФ РМЖ – 27 и 7 % случаев соответственно), редкие формы рака – 5 и 5 % случаев, рак без указания гистологической формы – в 31 и 56 % случаев соответственно.

И при первичной, и при вторичной форме ОИФ РМЖ преобладали рецепторнегативные по обоим видам рецепторов опухоли, составившие 65 и 56 %; рецепторпозитивные по обоим видам рецепторов опухоли составили 11 и 19 % случаев соответственно.

Таким образом, анализ клинкоморфологических и биологических характеристик как первичной так и вторичной ОИФ РМЖ показал отсутствие существенных различий между ними.

На следующем этапе исследования был проведен анализ эффективности лечения в зависимости от его вариантов и основных факторов прогноза.

Из вариантов лечения и в первичной и во вторичной форме ОИФ РМЖ сочетания местного и системного воздействия, включающие в себя трехкомпонентные режимы (химиотерапия или гормонотерапия/операция/лучевая терапия в различных очередностях), составили 35 и 45 % случаев, двухкомпонентные режимы (химиотерапия или гормонотерапия/операция/лучевая терапия в различных очередностях) – 33 и 32 % случаев или монорежимы (химиотерапия/гормонотерапия или их сочетание) – 32 и 24 % случаев соответственно.

Из схем неoadъювантной ХТ преобладали антрациклинсодержащие (45 и 54 %), реже CMF – 13 и 13 % случаев, таксаны – 8 и 7 %, сочетание различных схем отмечено в 20 и 17 % в первой и во второй исследуемой группах соответственно. ЛТ в предоперационном лечении использовалась в 54 % случаев в обеих группах, а в послеоперационном лечении – в 5 и 13 % случаев соответственно.

Таблица

Клиническая характеристика первичной и вторичной ОИФ РМЖ

Критерии	Первичная ОИФ РМЖ	Вторичная ОИФ РМЖ
Средний возраст, лет	49,6±10,1	51,5±10,1
Стадии:		
– T ₄ N ₀ M ₀	5 (8 %)	5 (2 %)
– T ₄ N ₁₋₃ M ₀	33 (56 %)	186 (63 %)
– T ₄ N ₀₋₃ M ₁	21 (36 %)	89 (35 %)
Репродуктивная функция:		
– сохранена	31 (53 %)	95 (40 %)
– отсутствует	28 (47 %)	145 (60 %)
Гистологическое строение:		
1. протоковый рак	16 (27 %)	105 (44 %)
2. дольковый рак	4 (7 %)	41 (17 %)
3. редкие формы рака	3 (5 %)	12 (5 %)
4. рак без указания формы	36 (61 %)*	82 (34 %)*
Рецепторный статус:		
– Определялся	37 (63 %)	188 (65 %)
– РЭ(+)РП(+)	4 (11 %)	35 (19 %)
– РЭ(-)РП(-)	24 (65 %)	106 (56 %)
– РЭ(+)РП(-)*	3 (8%)*	31 (17%)*
– РЭ(-)РП(+)*	6 (16%)*	16 (8%)*

РЭ – рецепторы эстрогенов, РП – рецепторы прогестерона;

*Скорректированные значения

В схемах адъювантной ХТ первичной ОИФ РМЖ преобладал режим CMF (41 и 18 % соответственно), а вторичной формы – антрациклины – 53 и 30 % соответственно, таксаны использовались в 7 и 10 % случаев, сочетания различных режимов химиотерапии – в 7 и 5 % случаев при первичной и вторичной ОИФ РМЖ соответственно.

Эффект от лечения (неоадъювантного или адъювантного) установлен рядом авторов как фактор прогноза выживаемости. Поэтому мы сочли необходимым провести анализ ряда факторов, влияющих на эффект от проводимого лечения, с целью выявления наиболее значимых.

В исследование вошли 264 пациентки среднего периода наблюдения за которыми составил не менее 12 мес, что позволило нам более объективно проанализировать различные аспекты лечения, начиная от клинических данных и заканчивая вариантами терапии.

Анализ кривых БРВ в зависимости от ответа на первичное лечение показал наличие достоверных различий.

Так, у больных с полным эффектом средняя БРВ составила 94,3±11,8 мес. (95 %-ный ДИ 71,3–117,3 мес.), медиана не достигнута, у больных с частичным эффектом – 81,4±10,3 мес. (95 %-ный ДИ 61,1–101,6 мес.) с медианой 46±8,6 мес., у больных со стабилизацией – 74,4±10,4 мес. (95 %-ный ДИ 54,1–94,7 мес.) с медианой 28±4,3 мес. и 17,1±2,1 мес. (95 %-ный ДИ 13,0–21,2 мес.) с медианой 11±1,5 мес. у больных с прогрессированием (p<0,0001; рис. 1).

Установлена прямая корреляция между эффектом от лечения и 3-летней БРВ, составившей 29,8 %. Ее распределение в зависимости от эффективности лечения было следующим: 59,1 % – для пациенток с ПЭ, 53,5 % – для пациенток с ЧЭ, 30,5 % – для пациенток со стабилизацией и 8,6 % для больных с прогрессированием (p 0,0001).

Аналогичная зависимость отмечена и для 5- и 10-летней БРВ, составившими 19,3 и 6,5 % с распределением: 50,0 %; 36,6 %; 20,4 %; 2,5 % и 22,0 %; 20,0 %; 6,4 % и 0 % для больных с ПЭ, ЧЭ, стабилизацией и прогрессированием соответственно (p<0,0001).

Анализ БРВ не выявил достоверных различий между таковой при первичной и вторичной ОИФ РМЖ. Так, средняя БРВ составила 57,0±9,8 мес. (95 %-ный ДИ 37,8–76,3 мес.) с медианой 22±4,4 мес. и 62,6±6,0 мес. (95 %-ный ДИ 50,8–73,4 мес.) с медианой 24 2,4 мес. соответственно (рис. 2).

Проведен многофакторный анализ БРВ пациенток ОИФ РМЖ, включающий в себя такие признаки как форма заболевания, репродуктивный статус, гистологическое строение опухоли, эффект от первичного лечения, варианты химиотерапии, стадию заболевания, показавший наличие статистически достоверных различий только по эффекту от лечения (p<0,0001).

Анализ общей выживаемости в зависимости от ответа на лечение также выявил достоверные различия. Так, при ПЭ средняя выживаемость составила 86,0±11,3 мес. (95 %-ный ДИ 64,9–109,0 мес.), медиана не достигнута, при ЧЭ – средняя выживаемость 89,3±9,6 мес. (95 %-ный ДИ 70,5–108,1 мес.), медиана – 71±15,5 мес. (95 %-ный ДИ, 40,7–101,3 мес.), при стабилизации – средняя выживаемость 76,5±8,9 мес. (95 %-ный ДИ, 59,1–94,0 мес.), а медиана – 47±11,5 мес. (95 %-ный ДИ, 24,5–64,5 мес.), а при прогрессировании болезни – средняя выживаемость 35,2±3,4 мес. (95 %-ный ДИ, 28,9–41,6 мес.), медиана – 24±2,3 мес. (95 %-ный ДИ, 19,5–28,6 мес.) (p<0,0001; рис. 3).

Нами выявлены статистически достоверные различия в 3-летней ОВ, составившей 52,8 %, которая распределялась следующим образом: у больных с ПЭ – 69,6 %, при ЧЭ – 70,2 %, при стабилизации – 52,3 %, а при прогрессировании – 38,0 % (p<0,001).

Похожая зависимость отмечена и для 5- и 10-летней ОВ, составившими 31,0 и 8,3 % с соответствующим подразделением на 50,0 %; 47,7 %; 36,7 %; 11,0 % и 8,3 %; 22,2 %; 9,8 %; 0 % для больных с ПЭ, ЧЭ, стабилизацией и прогрессированием соответственно (p<0,0001).

При анализе ОВ пациенток с первичной и вторичной ОИФ РМЖ установлено, что форма заболевания не оказывает достоверного влияния на ОВ, составив 64,3±8,7 мес. (95 %-ный ДИ; 47,3–81,2 мес.) с медианой 47±22,1 мес. и 71,7±5,5 мес. (95 %-ный ДИ; 60,9–82,5 мес.) с медианой 39±2,9 мес. соответственно (рис. 4).

Проведенный многофакторный анализ ОВ по ряду признаков: форма заболевания, менструальный статус, стадия, рецепторный статус, схема химиотерапии, эффект от лечения, гистологическое строение опухоли, появление отдаленных метастазов – показал наличие статистически достоверных преимуществ в ОВ у больных с инфильтративным протоковым раком по сравнению с таковыми, страдающими инфильтративным дольковым раком и редкими формами рака, и ПЭ, ЧЭ, стабилизации по сравнению с прогрессирующим опухолевым процессом ($p < 0,002$).

Обсуждение

В настоящее время в классификациях TNM и FIGO ОИФ РМЖ относится к МР РМЖ, хотя и обладает более агрессивным течением и соответственно худшим прогнозом.

По данным М. Cristofanilli et al. [10], 3-летняя выживаемость ОИФ РМЖ не превышает 30–40 %, тогда как при МР РМЖ она достигает 85 %.

В исследовании J. Low et al. [30] 10-летняя ОВ составила 44,8 % для МР РМЖ и 26,7 % для ОИФ РМЖ ($p = 0,031$). В нашем исследовании 3-, 5- и 10-летняя ОВ больных ОИФ РМЖ составила 52,8; 31,0 и 8,3 % соответственно.

Разделение ОИФ РМЖ на первичную и вторичную формы основывается в основном на различиях в их клинических проявлениях и возможных молекулярно-биологических особенностях.

Многие авторы отмечают сходные результаты лечения этих форм РМЖ [2; 3; 19; 28], тогда как другие считают течение и прогноз вторичной ОИФ РМЖ более благоприятным, увязывая его с МР РМЖ с последующим отеком кожи [3; 7].

Недавнее исследование G. Gruber et al. [15] выявило улучшение БРВ и ОВ при сравнении больных с наличием интрадермальных опухолевых эмболов и отсутствием классических признаков воспаления (вторичной ОИФ РМЖ) и больных с наличием эмболов и признаков воспаления (первичной ОИФ РМЖ), указывая на возможные биологически различные характеристики у данных форм заболевания.

Классический признак «poor prognosis» / плохого прогноза РМЖ – негативный рецепторный статус – имеет по одним данным важное прогностическое значение при ОИФ РМЖ [24; 31], а по другим – нет [28; 33].

При ОИФ РМЖ чаще, чем при других формах РМЖ отмечается РЭ негативные опухоли [24; 33].

До 60 % больных ОИФ РМЖ имеют рецептор-негативный статус [4; 33]. Отсутствие РЭ и РП связано с низкой БРВ и ОВ у пациенток с РМЖ, включая больных ОИФ РМЖ [23].

В исследовании R. Nahnel et al. [16] выявлен преимущественно негативный рецепторный статус ОИФ РМЖ, причем сами по себе уровни РЭ и РП не показали прогностического значения.

В нашем исследовании и при первичной, и при вторичной форме РМЖ преобладали рецептор-негативные по обоим видам рецепторов опухоли, составившие 65 и 56 %, что свидетельствует о прогностически сходных по рецепторному статусу свойствах первичной и вторичной ОИФ РМЖ.

Ответ на химиотерапию может быть важным прогностическим фактором при ОИФ РМЖ как при МР РМЖ и операбельных опухолях, леченных на первом этапе неoadъювантной химиотерапией.

Рост частоты морфологического ответа на лечение, особенно полного, связан с улучшением прогноза [21; 26].

При ОИФ РМЖ частота клинического ответа коррелировала с выживаемостью [26; 29; 36]. Ряд работ, изучавших морфологический ответ на химиотерапию, указывает на важное прогностическое значение данного признака при ОИФ РМЖ [5; 9; 12; 18; 32].

В проведенном исследовании подтверждается важная роль ответа на проведенное лечение.

Мы установили, что для пациенток с ПЭ 3-летняя БРВ составила 59,1 %; 53,5 % – при ЧЭ; 30,5 % – для пациенток со стабилизацией и 8,6 % – для больных с прогрессированием ($p < 0,0001$).

Аналогичная тенденция сохраняется и для 5- и 10-летней БРВ. Результаты 3-летней ОВ также подтверждают данную закономерность: у больных с ПЭ она составила 69,6 %, при ЧЭ – 70,2 %, при стабилизации – 52,3 %, а при прогрессировании – 38,0 % ($p < 0,001$). Эта же тенденция сохраняется и для 5- и 10-летней ОВ.

Проведенный анализ БРВ не выявил достоверных различий между первичной и вторичной ОИФ РМЖ. Так, средняя БРВ у пациенток с первичной ОИФ РМЖ составила 57,0±9,8 мес. с медианой 22±4,4 мес. и 62,6±6,0 мес. с медианой 24±2,4 мес.

При анализе ОВ пациенток с первичной и вторичной ОИФ РМЖ нами также установлено, что форма заболевания не оказывает достоверного влияния на ОВ данной категории женщин, составив 64,3±8,7 мес. с медианой 47±22,1 мес. и 71,7±5,5 мес. с медианой 39±2,9 мес. соответственно.

Выводы

Подводя итог проведенному исследованию, следует отметить, что нами не выявлено достоверных различий в клинико-морфологических и биологических особенностях (возраст, менструальный статус, степень распространенности опухолевого процесса, гистологическое строение опухоли, рецепторный статус опухоли) первичной и вторичной ОИФ РМЖ.

Лечение обеих форм данного заболевания также не имело существенных различий и, чаще всего, было комплексным.

Не получено достоверных различий и в результатах безрецидивной и общей выживаемости больных первичной и вторичной ОИФ РМЖ.

При проведении многофакторного анализа мы установили эффект от проведенного лечения как один из наиболее значимых прогностических факторов ОИФ РМЖ.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о схожести первичной и вторичной ОИФ РМЖ по приведенным выше факторам.

Однако следует отметить, что и наше, и большинство проведенных исследований, носят ретроспективный характер и зачастую малочисленны ввиду низкой частоты встречаемости данной патологии, что накладывает определенные ограничения на полученные результаты и требует проведения дальнейших рандомизированных кооперированных многоцентровых исследований с учетом новых генно-молекулярных возможностей, что позволит внести дополнительную ясность в решение проблемы необходимости разделения ОИФ РМЖ на первичную и вторичную формы.

Литература

1. Бокерия Л.А., Асланиди И.П., Беришвили А.И. и др. Позитронная эмиссионная томография при раке молочной железы // *Анналы хирургии*. – 2005. – 2. – С. 38–43.
2. Портной С.М. Возможности лечения отечно-инфильтративной формы рака молочной железы // VIII Российский онкологический конгресс. – 2004. – С. 31–5.
3. Amparo R.S., Angel C.D., Ana L.H. et al. Inflammatory breast carcinoma: pathological or clinical entity? // *Breast Cancer Res Treat.* – 2000. – Vol. 64. – P. 269–73.
4. Anderson W.F., Chu K.C., Chang S. Inflammatory breast carcinoma and noninflammatory locally advanced breast carcinoma: distinct clinicopathologic entities? // *J Clin Oncol.* – 2003. – Vol. 21. – P. 2254–9.
5. Boer R., Allum W., Ebbs S. et al. Multimodality therapy in inflammatory breast cancer: is there a place for surgery // *Annals of Oncology*. – 2000. – Vol. 11. – P. 1147–53.
6. Bonnefoi H., Diebold-Berger S., Therasse P. et al. Locally advanced/inflammatory breast cancers treated with intensive epirubicin-based neoadjuvant chemotherapy: are there molecular markers in the primary tumour that predict for 5-year clinical outcome? // *Ann. Oncol.* – 2003. – Vol. 14. – P. 406–13.
7. Buzdar A.U., Singletary S.E., Booser D.J. et al. Combined modality treatment of stage III and inflammatory breast cancer: M.D. Anderson Cancer Center experience // *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* – 1995. – Vol. 4. – P. 715–733.
8. Chang S., Parker S.L., Pham T., Buzdar A.U., Hursting S.D. Inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program of the National Cancer Institute, 1975–1992 // *Cancer*. – 1998. – Vol. 82. – P. 2366–72.
9. Chevallier B., Roche H., Olivier J.P. et al. Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction chemotherapy (FEC-HD) results in a high histologic response rate // *Am J Clin Oncol.* – 1993. – Vol. 16. – P. 223–8.
10. Cristofanilli M., Buzdar U., Hortobágyi G. N. Update on the Management of Inflammatory Breast Cancer // *The Oncologist*. – 2003. – Vol. 8(2). – P. 141–8.
11. Curcio L., Rupp E., Williams W. et al. Beyond palliative mastectomy in inflammatory breast cancer – a reassessment of margin status // *Annals of Surgical Oncology*. – 1998. – Vol. 6(3). – P. 249–54.
12. Fleming R.Y., Asmar L., Buzdar A.U. et al. Effectiveness of mastectomy by response to induction chemotherapy for control in inflammatory breast carcinoma // *Ann. Surg. Oncol.* – 1997. – Vol. 4. – P. 452–61.
13. Giordano S.H., Hortobagyi G.N. Inflammatory breast cancer. Clinical progress and the main problems that must be addressed // *Breast Cancer Research*. – 2003. – Vol. 5. – P. 284–8.
14. Gonzalez-Angulo A.M., Hennessy B.T., Broglio K. et al. Trends for Inflammatory Breast Cancer: Is Survival Improving? // *The Oncologist*. – 2007. – Vol. 12(8). – P. 904–12.
15. Gruber G., Ciriolo M., Altermatt H.J. et al. Prognosis of dermal lymphatic invasion with or without clinical signs of inflammatory breast cancer // *Int. J. Cancer*. – 2004. – Vol. 109. – P. 144–8.
16. Hahnel R., Twaddle E. Estrogen receptors in human breast cancer.1. Methodology and characterization of receptors // *Steroids*. – 1971. – Vol. 18. – P. 653–80.
17. Hance K.W., Anderson W.F., Devesa S.S. et al. Trends in inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program at the National Cancer Institute // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2005. – Vol. 97. – P. 966–75.
18. Harris E.E., Schultz D., Bertsch H. et al. Ten-year outcome after combined modality therapy for inflammatory breast cancer // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2003. – Vol. 55. – P. 1200–8.
19. Henderson I.C., Patek A.J. The relationship between prognostic and predictive factors in the management of breast cancer // *Breast Cancer Res Treat.* – 1998. – Vol. 52. – P. 261–88.
20. Henderson M.A., McBride C.M. Secondary inflammatory breast cancer: treatment options // *South Med J.* – 1988. – Vol. 81. – P. 1512–7.
21. Honkoop A.H., van Diest P.J., de Jong J.S. et al. Prognostic role of clinical, pathological and biological characteristics in patients with locally advanced breast cancer // *Br. J. Cancer*. – 1998. – Vol. 77. – P. 621–6.
22. Jaiyesimi I.A., Buzdar A.U., Hortobagyi G. Inflammatory breast cancer: a review // *J Clin Oncol.* – 1992. – Vol. 10. – P. 1014–24.
23. Kaufman M. Review of known prognostic variables // *Results Probl Cell Differ.* – 2000. – Vol. 140. – P. 77–87.
24. Kleer C., van Golen K., Merajver S. Molecular biology of breast cancer metastasis: Inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular determinants // *Breast Cancer Res.* – 2000. – Vol. 2(6). – P. 423–9.

25. Kleer C., van Golen K.L., Braun T., Merajver S.D. Persistent E-cadherin expression in inflammatory breast cancer // *Mod. Pathol.* – 2001. – Vol. 14. – P. 458–64.
26. Kuerer H.M., Newman L.A., Smith T.L. et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy // *J. Clin. Oncol.* – 1999. – Vol. 17. – P. 460–9.
27. Lee B.J., Tannenbaum N.E. Inflammatory carcinoma of the breast: a report of twenty-eight cases from the breast clinic of Memorial Hospital // *Surg Gynecol Obstet.* – 1924. – Vol. 39. – P. 580–95.
28. Lerebours F., Bertheau P., Bieche I. et al. Two prognostic groups of inflammatory breast cancer have distinct genotypes // *Clin Cancer Res.* – 2003. – Vol. 9. – P. 4184–9.
29. Liauw S.L., Benda R.K., Morris C.G. et al. Inflammatory breast carcinoma: Outcomes with trimodality therapy for nonmetastatic disease // *Cancer.* – 2004. – Vol. 100(5). – P. 920–8.
30. Low J.A., Berman A.W., Steinberg S.M. et al. Long-term follow-up for inflammatory (IBC) and non-inflammatory (NIBC) stage III breast cancer patients treated with combination chemotherapy // *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* – 2002. – Vol. 21. – 63a.
31. Palangie T., Mosseri V., Mihura J. et al. Prognostic factors in inflammatory breast cancer and therapeutic implications // *Eur. J. Cancer.* – 1994. – Vol. 7. – P. 921–7.
32. Panades M., Olivotto I.A., Speers C.H. et al. Evolving treatment strategies for inflammatory breast cancer: a population-based survival analysis // *J. Clin. Oncol.* – 2005. – Vol. 23. – P. 1941–50.
33. Paradiso A., Tommasi S., Brandi M. et al. Cell kinetics and hormonal receptor status in inflammatory breast carcinoma. Comparison with locally advanced disease // *Cancer.* – 1989. – Vol. 64. – P. 1922–7.
34. Piera J.M., Alonso M.C., Ojeda M.B., Biete A. Locally advanced breast cancer with inflammatory component: a clinical entity with a poor prognosis // *Radiother. Oncol.* – 1986. – Vol. 7. – P. 199–204.
35. Turpin E., Bieche I., Bertheau P. et al. Increased incidence of ERBB2 overexpression and TP53 mutation in inflammatory breast cancer // *Oncogene.* – 2002. – Vol. 21. – P. 7593–7.
36. Ueno N.T., Buzdar A.U., Singletary S.E. et al. Combined-modality treatment of inflammatory breast carcinoma: twenty years of experience at M.D. Anderson Cancer Center // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 40. – P. 321–9.

Е.В. Лукашева¹, О.С. Жукова², А.Ю. Аринбасарова³, А.Г. Меденцев³, К.В. Макрушин³, Е.М. Трещалина², А.Ю. Барышников², Т.Т. Березов¹

ПОЛУЧЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ L-ЛИЗИН- -ОКСИДАЗЫ С АНТИТЕЛАМИ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ

¹ГОУ ВПО РУДН, Москва

²РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва

³ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН, Пушкино-на-Оке

Цель исследования. Разработка путей иммобилизации и направленного транспорта L-лизин- -оксидазы (ЛО).

Материалы и методы. Ферментативную активность ЛО определяли по скорости накопления H₂O₂ в реакции окислительного дезаминирования L-лизина с помощью пероксидазы и ее хромогенного субстрата о-дианизидина. Методами химической модификации молекулы ЛО периодатом натрия (NaIO₄), пероксидазой (ПХ) или глутаровым альдегидом (ГА), получали функционально активные группы для связывания с антителами (АТ). Далее осуществляли реакцию с АТ или с моноклональными антителами (МКА) ICO-80 к рецептору CD5 на клетках линии Yurkat. Об эффективности конъюгации судили по ферментативной активности (ФА) и цитотоксичности.

Цитотоксичность определяли при концентрации агента 5 · 10⁻⁵ Е/мл с помощью МТТ-теста на клеточных линиях CaOv или Yurkat через 48 ч по проценту ингибирования = число погибших клеток/число метаболически активных клеток.

Результаты. Конъюгаты ЛО-ПХ показали ФА=0,36–1,2 % от исходной, цитотоксичность на CaOv составила 24 % против 36,7 % для ЛО. Предобработка фермента NaIO₄ с удалением агента и реакцией с АТ привела к увеличению ФА до 5 % при снижении цитотоксичности до 9,9 %.

Получение «мостиковой» молекулы, несущей на поверхности центры для ковалентного связывания с аминокислотами как ЛО, так и АТ, привело к увеличению ФА до 80 %. Роль такого «мостика» выполняла окисленная по углеводному компоненту NaIO₄ пероксидаза (ПХ) с альдегидными группами на поверхности.

Однако цитотоксичность конъюгатов ЛО-ПХ-АТ все же не достигла ЛО и составила 19 %.

Использование ГА для получения конъюгата с МКА ICO-80 привело к ФА=65 % без изменения специфичности связывания с рецепторами на Yurkat при цитотоксичности конъюгата на уровне ЛО.

Вывод. Использование ГА для создания «мостика» между молекулой ЛО и АТ позволяет получить конъюгат с высокой ФА без выигрыша по цитотоксичности.

Разработанный метод конъюгации может быть использован для создания нового поколения лекарственных средств направленного транспорта в организме.

УДК 616-006.448:615.277.3.015.46:616-092.4

А.Н. Иншаков¹, Н.А. Оборотова¹, А.Ю. Барышников¹, Е.В. Трифонова², Е.В. Катаева², А.К. Голенков²**ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ САРКОЛИЗИНА *IN VITRO* И ЕГО КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИ РЕЗИСТЕНТНЫХ ФОРМАХ ММ**¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва²МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва**Контактная информация:**

Иншаков Андрей Николаевич, научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей.

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(926)179-04-20**e-mail:** aberishvili@yandex.ru

Статья поступила: 02.06.2009 г., принята к печати: 23.09.2009 г.

Резюме

DiSC-методом определяли чувствительность миеломных клеток *in vitro* к 5 химиопрепаратам, входящим в схемы М-2 и ЦСВП, у 10 резистентных больных множественной миеломой. Обнаружили, что наиболее эффективные препараты в этой группе – сарколизин и алкеран (100 % чувствительных больных). Однако скрининговая концентрация сарколизина (0,69–0,13 мкг/мл), при которой гибнет 70 % опухолевых клеток, была достоверно в 2,3 раза меньше по сравнению с концентрацией алкерана (1,61±0,82; $p<0,05$). По результатам DiSC-метода, десяти клинически резистентным больным провели монотерапию сарколизинем и получили положительный клинический ответ в 6 случаях.

Ключевые слова: множественная миелома, DiSC-метод, резистентность, сарколизин.A.N. Inshakov¹, N.A. Oborotova¹, A.Yu. Baryshnikov¹, E.V. Trifonova², E.V. Kataeva², A.K. Golenkov²**THE EFFECT OF SARCOLIZINE *IN VITRO* ON PATIENTS WITH RESISTANT FORM OF MULTIPLE MYELOMA**¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow²M.F. Vladimirovsky Clinical Institute of Moscow Region, Moscow**Abstract**

We have examined the sensitivity of myelocytic cells of patients with resistant form of multiple myeloma to five anticancer drugs including Russian anticancer drug sarcolizine by DiSK-method *in vitro*. In this small group of anticancer drugs, sarcolizine and alkeran were most effective drugs. The concentration of sarcolizine (0,69±0,13 mkg/ml) which include 70 % of cells death was 2,3-fold less than the concentration of alkeran induced the same effect. Based on data of DiSK-method, treatment of 10 patients with resistant form of multiple myeloma was performed. The positive effect was observed in 6 of cases.

Key words: multiple mieloma, DiSC-assay, resistance, sarcolysin.**Введение**

Множественная миелома – системное злокачественное В-лимфопролиферативное заболевание, морфологическим субстратом которого являются плазматические клетки, продуцирующие моноклональный парпротеин (Plg). В структуре всех злокачественных новообразований ММ составляет 10–15 % [1].

Важной клинической проблемой является первичная или вторичная устойчивость клеток больных ММ к проводимым курсам ХТ. Как показали наблюдения, первичная резистентность к стандартным режимам ХТ при ММ встречается в 20 % случаев, и этот процент увеличивается практически до абсолютных значений по мере проведения цитостатического лечения [1; 2].

В настоящее время определены подходы к лечению устойчивых форм ММ, которые заключаются в последовательном использовании нескольких программ химиотерапии. Существенным фактором этих подходов является эмпирический принцип, проявляющийся как в подборе противоопухолевых препаратов, входящих в химиотерапевтические комбинации, так и в смене этих программ. Однако этот прин-

цип далеко не всегда дает желаемый клинический результат. Довольно часто предложенные комбинации цитостатиков суммируют миелотоксический эффект каждого препарата и таким образом несколько увеличивают противоопухолевую эффективность в целом, но это не является результатом искомого повышения избирательности противоопухолевого действия.

Определение чувствительности опухолевых клеток при лейкозах к цитостатическим препаратам *in vitro* [4] может стать актуальным направлением и в преодолении резистентности миеломных клеток к противоопухолевым препаратам. Причем функция этого подхода достаточно широкая и заключается в скрининговом поиске новых противоопухолевых препаратов с высокой активностью против ММ. [5]. С клинической точки зрения при возникновении рецидива или устойчивости клеток больного к ранее проводимому цитостатическому лечению важно тестировать опухолевые клетки больного *in vitro* к препаратам, входящим в применяемые курсы ПХТ, и удалять из них малоэффективные препараты. Таким образом можно по-новому формировать комбинацию ХТ, меняя доминирующий препарат и учитывая результаты *in vitro*, то есть осуществлять индивидуальный подход к каждому пациенту.

Материалы и методы

В исследовании представлены результаты лечения 10 больных ММ, возраст которых варьировал от 43 до 78 лет (ср. 58,4 года). Всем больным проводилось предшествующее лечение программной ПХТ, вследствие чего у них развилась резистентность к проводимой ранее терапии. Резистентными считались больные, не отвечающие на 2 и более курса ХТ.

Исследование чувствительности миеломных клеток к химиопрепаратам проводили не менее чем через 2 мес. после последнего курса.

Определение чувствительности опухолевых клеток к препаратам DiSC-методом (*differential staining cytotoxicity*)

Клетки костного мозга больных ММ получали при стерильной пункции в стерильные пробирки с раствором гепарина (500 U/мл). Гепаринизированный костный мозг смешивали с 10% раствором желатина до конечной концентрации 1 % и помещали на 30–45 мин в термостат при 37 °C. После расслаивания верхний слой осторожно переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали 10 мин при скорости 1000 об/мин. Для полного удаления эритроцитов осадок ресуспензировали в 1 мл раствора для лизиса эритроцитов и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, затем клетки дважды промывали средой 199 в указанных условиях. Подсчет клеток проводили в камере Горяева общепринятым методом. Выделенные из костного мозга клетки раскапывали в концентрации $0,5\text{--}2 \times 10^5$ в 180 мкл полной среды RPMI-1640 в 96-луночные круглодонные планшеты (Costar, USA). Добавляли по 20 мкл в лунку каждого исследуемого препарата. Каждый препарат исследовали в 5 концентрациях (табл. 1). В контрольные лунки с клетками добавляли по 20 мкл чистой среды RPMI-1640. Планшеты с клетками инкубировали в течение 96 ч при 37 °C в атмосфере 5% CO₂.

Алкеран (Glaxo Wellcome, UK): флакон, содержащий 50 мг лиофилизированного препарата. Разводили прилегающим растворителем до конечной стоковой концентрации 1,25 мг/мл. Препарат готовили непосредственно перед постановкой тестов, разведенный препарат не хранили.

Сарколизин (ООО Фирма ГЛЕС): флакон, содержащий 20 мг лиофилизированного препарата. Разводили NaCl 0,9% до конечной стоковой концентрации 1,25 мг/мл. Препарат готовили непосредственно перед постановкой тестов, разведенный препарат не хранили.

Через 96 ч планшет с клетками центрифугировали при 500 оборотах в минуту 5 мин на центрифуге (Backman, USA). Автоматической пипеткой из каждой лунки отбирали 100 мкл среды, добавляли 100 мкл 2%-ного раствора Fast green-nigrosin и ресуспендировали. Через 10 мин 100 мкл клеточной суспензии добавляли в камеру цитоцентрифуги (Hettich Zentrifugen, Германия) и осаждали при 1200 оборотах в минуту 10 мин на предметное стекло (25×75×1,0) через фильтр (Hettich Zentrifugen, Германия). Стекла с осажденными клетками фиксировали в метиловом спирте 20–30 с и высушивали. Фиксированные стекла окрашивали по Романовскому.

Подсчет клеток производили на световом микроскопе («Zeiss», Германия), при оптическом увеличении ×400 или ×1000 с использованием иммерсионного масла («Zeiss», Германия). В каждом отпечатке подсчитывали 100 клеток. «Мертвые» клетки окрашивались раствором Fast green-nigrosin

в темно-зеленый или почти черный цвет. «Живые» опухолевые и нормальные клетки окрашивались стандартно.

Процент живых опухолевых клеток вычисляли по формуле:

$$N_0 = N_1 / (N_1 + N_2 + N_3) \times 100 \%, \text{ где}$$

N_0 – процент живых опухолевых клеток;

N_1 – число живых опухолевых клеток;

N_2 – число мертвых клеток;

N_3 – число живых нормальных клеток.

Для каждого препарата строили график зависимости «доза – эффект» и определяли LD₇₀ (концентрацию, которая вызывала гибель 70 % клеток). Клетки опухоли считали чувствительными к химиопрепаратам, если значение LD₇₀ было меньше терапевтической концентрации в плазме.

Противоопухолевый ответ оценивали по критериям эффективности SWOG (1972 г.), характеризующим соотношение степени снижения парапротеина в сыворотке и моче с клиническими проявлениями.

Полный ответ регистрировали при снижении сывороточного парапротеина на 75 % и более, снижении мочевого парапротеина на 90 % и более. ЧО регистрировали при снижении сывороточного парапротеина на 50–75 %, снижении мочевого парапротеина на 50–90 %. ОбО регистрировали при снижении сывороточного парапротеина на 25–50 %, снижении мочевого парапротеина на 25–50 %.

ОО – регрессия парапротеина менее чем на 25 % или прогрессирование. ПЗ отмечали при нарастании экскреции или появлении белка Бенс-Джонса, появлении новых очагов остеодеструкций, снижении показателей Hb и эритроцитов без признаков кровопотери и гемолиза, развитии гиперкальциемии.

Результаты и обсуждение

Была исследована чувствительность *in vitro* опухолевых плазмочитов костного мозга 10 клинически резистентных больных ММ к препаратам, входящим в индукционные схемы М-2 и ЦСВП: винкристину, алкерану, сарколизину, преднизолону, белустину. Чувствительность миеломных клеток *in vitro* не определяли к циклофосфану, так как этот препарат превращается в цитотоксический метаболит благодаря системе оксидаз цитохрома Р-450, локализованного в печени [3]. На рис. 1 показана чувствительность опухолевых клеток 10 резистентных больных ММ к преднизолону, винкристину, белустину, алкерану, сарколизину.

Оценивая результаты проведенного исследования *in vitro*, можно сделать вывод, что противоопухолевая активность в схемах лечения сохранилась только у алкерана и сарколизина (100 % чувствительных к ним больных). Таким образом, изученная фармакодинамическая модель схем ПХТ М-2 и ЦСВП в культуре миеломных клеток резистентных больных ММ представляет собой комбинацию препаратов, обладающих различной противоопухолевой активностью. При эмпирическом назначении такой комбинации резистентным больным с вероятностью 100 % активностью будут обладать только алкеран и сарколизин. Остальные препараты в 40 и 43 % случаев активны не будут.

Кроме того, остается неизученной противоопухолевая активность комбинации препаратов, входящих в схему в целом, которая может обладать потенцирующим, ингибирующим или нейтральным действием. В связи с этим в той или иной степени может нарастать суммированная токсичность без усиления противоопухолевого эффекта.

Таблица 1

Концентрации используемых препаратов

Препарат	Конц _{сток} , мг/мл	V _{сток} , мл	Конц _{тах} в лунке, мг/мл	Шаг разведения
Винкристин	1	0,8	0,05	4
Преднизолон	25	0,4	0,25	8
Белустин	40	0,4	0,04	3
Алкеран	1,25	—	0,0125	2
Сарколизин	1,25	—	0,0125	2

Таблица 2

Клинический эффект сарколизина у резистентных больных ММ (n=10)

Группы	Клинический ответ	Общий %
Отвечившие (n=6)	1 ПО (10 %)+2 ЧО (20 %)+3 О6О (30 %)	60
Не отвечающие (n=4)	1 ОО (10 %)+3 ПЗ (30 %)	40

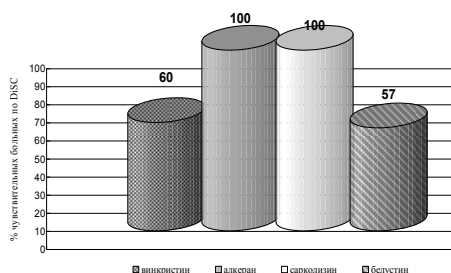


Рис. 1. Чувствительность опухолевых клеток резистентных больных ММ *in vitro* к химиопрепаратам, входящим в схемы М-2 и ЦСВП.

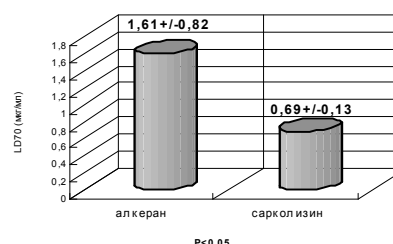


Рис. 2. Сравнение значений LD₇₀ алкерана и сарколизина, полученных DiSC-методом у больных ММ *in vitro* (n=10).

На основании вышесказанного можно предположить, что выделение из комбинаций М-2 или ЦСВП сарколизина и применение его в режиме монотерапии резистентным больным ММ позволит создать дозовое преимущество и исключить вероятное ингибирование противоопухолевого эффекта комбинации в целом.

Сарколизин взят для клинического исследования в связи с тем, что его «удельная» противоопухолевая активность *in vitro*, отнесенная к концентрации, выше, чем алкерана. Частота чувствительности опухолевых плазмочитов резистентных больных ММ *in vitro* к сарколизину и алкерану одинакова (100 %).

Однако скрининговая концентрация сарколизина, при которой гибнет 70 % опухолевых клеток, в 2,3 раза достоверно меньше по сравнению с таковой алкерана (p<0,05), (рис. 2). Итак, 10 резистентным к программным схемам М-2 и ЦСВП больным ММ было проведено в среднем 6 (от 1 до 14) курсов терапии сарколизин, курсовая доза составила 70 мг (от 60 до 100), что на 43 % превышает суммарную дозу аналога сарколизина алкерана в индукционных схемах. Сарколизин вводили внутривенно, в РД доза составляла 20 мг.

Литература

1. Андреева Н.Е., Балакирева Т.В. Парпротеинемические гемобластозы: Множественная миелома, макроглобулинемия Вальденстрема, болезни тяжелых цепей. – Руководство по гематологии под ред. Воробьева А.И. – Тверь: ООО Издательство «Триада», 2003. – С. 88.
2. Голеньков А.К., Шабалин В.Н. Множественная миелома. – СПб: Гиппократ, 1995. – С. 144.
3. Фрешни Р. Культура животных клеток. Методы. – М.: Мир, 1989. – С. 264–265.
4. Kaspers G.J.L., Pieters R., Veerman A.J.P. Glucocorticoid sensitivity and resistance in childhood leukemia. – Drug resistance in leukemia and lymphoma II. Edited by Pieters R., Kaspers G.J.L., Veerman A.J.P., Netherlands, 1997. – P. 95–103.
5. Yasui H. Anti-tumor activity of a novel immunosuppressant FTY-720 in multiple myeloma // Blood. – 2004. – Vol. 104. – P. 941-a.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ»

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

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

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

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

В основном файле должен содержаться текст статьи, таблицы, подписи и надписи к рисункам, список литературы. Кроме того, на дискете или CD должны быть записаны рисунки (каждый в виде отдельного файла). Штриховые и тоновые рисунки (фотографии, рентгенограммы и т.д.), то есть растровая графика, должны быть сохранены в виде файлов формата TIF или JPEG, графики и диаграммы (векторная графика) – в виде файла Microsoft Excel 5.0/95 с обязательным приложением в виде таблицы, по которой данный график построен.

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

Весь текст должен быть набран шрифтом Times New Roman 12 через полуторный интервал. Текст должен быть выровнен по левому краю. Все страницы должны быть пронумерованы. Номер страницы должен быть расположен внизу справа, начиная со второй. Каждый абзац должен начинаться с красной строки, которая устанавливается меню «Абзац». Не следует использовать для красной строки клавишу Tab. Десятичные дроби следует писать через запятую. При наборе текста следует различать дефис и тире. Последнее вводится одновременным нажатием клавиш Ctrl+Alt+дефис с дополнительной клавиатуры при горящем указателе Num Lock.

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

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

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

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

Статья должна быть написана ясно, четко, лаконично, тщательно выверена авторами, не содержать повторов и исправлений. Сокращения допустимы только в отношении часто встречающихся в статье терминов. Сокращение вводится при первом вхождении в круглых скобках и в дальнейшем используется по всему тексту. Не следует параллельно использовать термин и его сокращение. Если сокращений больше 10, следует вводить список сокращений. В статьях должна использоваться система СИ. В тексте должны быть указаны ссылки на таблицы и рисунки, например, **(табл. 1), (рис. 1)** или **на рис. 1** представлены... Они должны быть размещены в соответствующих по смыслу абзацах и последовательно пронумерованы. Рисунки и таблицы нумеруются отдельно.

Таблицы должны быть компактными, иметь название, не повторять графики, не должны содержать пустых ячеек (отсутствие данных должно отмечаться тире, «нет данных» или специальным примечанием). Все уточнения и локальные сокращения выносятся в примечания. Таблицы набираются тем же шрифтом, что и основной текст статьи с выравниванием по левому краю, без переносов и красных строк. Точку после последнего слова в ячейке ставить не нужно. Примечания к таблицам выносятся в последней строке таблицы тем же шрифтом. Каждое примечание должно располагаться с новой строки, помечено надстрочной цифрой, которая отделяется от текста примечания пробелом. В конце каждого примечания ставится точка. Примечания нумеруются в соответствии с их появлением в таблице: сверху вниз и слева направо.

Размер каждого рисунка (даже если они сматетированы вместе) должен быть не менее 10 × 15 см. Рентгенограммы должны быть представлены в негативном изображении. Иллюстрации сканируют в масштабе 100 % с разрешением 300 dpi. Рентгенограммы, сонограммы, фотографии сканируют в режиме «Gray». Если под одной подписью планируется несколько рисунков, каждый должен быть прислан отдельно и соответствовать указанным выше требованиям по качеству. Графики и схемы нельзя перегружать надписями. Подпись к рисунку должна быть лаконичной, точно соответствовать его содержанию. Если несколько рисунков идут под общей надписью, то сначала приводят ее, а затем названия отдельных рисунков под русскими буквами.

(окончание на стр. 92)

УДК 618.14-006.6:616.381-089.854

*Д.А. Шаповалов, И.Г. Комаров, В.В. Кузнецов, С.Ю. Слетина***ВИДЕОХИРУРГИЯ КАК МЕТОД РАДИКАЛЬНОГО ЛЕЧЕНИЯ И ПОЛНОЦЕННОГО СТАДИРОВАНИЯ РАКА ТЕЛА МАТКИ**

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация:

Шаповалов Дмитрий Алексеевич, аспирант хирургического отделения диагностики опухолей НИИ клинической онкологии.

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(495)324-12-70**e-mail:** shapovalov.dmitry@gmail.com

Статья поступила: 25.05.2009 г., принята к печати: 23.09.2009 г.

Резюме

Представлены непосредственные и отдаленные результаты радикального лечения и хирургического стадирования опухолей больных раком тела матки, оперированных с использованием современной видеохирургической техники в сравнении с лапаротомной методикой по данным проспективных и ретроспективных исследований, описанных в отечественной и зарубежной литературе. Анализированы факторы, влияющие на частоту регионарного метастазирования и чувствительность диагностических методик в отношении поражения регионарных лимфатических узлов.

Ключевые слова: рак тела матки, лапароскопия, видеохирургия, хирургическое стадирование.*D.A. Shapovalov, I.G. Komarov, V.V. Kuznetsov, S.Yu. Slyotina***THE COMPUTER SURGERY AS A METHOD OF FULL VALUE STAGING AND CURATIVE TREATMENT OF UTERUS CARCINOMA**

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

Abstract

In this review we discuss immediate and follow-up results of curative treatment and surgical staging of patients with uterus carcinoma which were operated with the use of modern compute technology. Here we compare the prospective and retrospective investigations with laparotomy. We have also analyzed the factors influencing the rate of metastasis, the sensitivity of diagnostic methods in context of lymph node' damdge.

Key words: uterus carcinoma, laparotomy, computer surgery, surgical staging of disease.**Введение**

В настоящий момент опухоли женских гениталий составляют 16,9 % среди всех злокачественных заболеваний у женщин, из них рак тела матки (РТМ) – 6,9 %, занимая первое место в структуре онкогинекологической заболеваемости [1; 3]. За последние 20 лет заболеваемость раком эндометрия увеличилась в России в 2 раза [1; 7; 9]. Такая же ситуация отмечается в Европе и США [23; 31]. Рак тела матки чаще встречается у женщин в возрасте старше 50–60 лет, преимущественно – в постменопаузальном периоде жизни, однако в последние годы заметна тенденция «омоложения» больных раком эндометрия [2; 3]. В структуре заболеваемости женского населения России злокачественными новообразованиями РТМ занимает 5 ранговое место, составляя 6,9 %. В 2006 г. в России зарегистрировано 17 885 новых больных РТМ [3]. До 1988 г., согласно рекомендациям FIGO, стадии рака тела матки определялись клинически, с учетом результатов раздельного диагностического выскабливания матки и длины полости матки по зонду. Послеоперационные находки свидетельствовали, что примерно у трети больных клиническая стадия устанавливалась неверно, а метастазы в тазовые и поясничные лимфатические узлы не выявлялись вообще. В связи с этим с 1998 г. FIGO рекомендует проводить определение стадии РТМ по результатам хирургического вмешательства. Разработанная FIGO клинко-морфологическая классификация стадий РТМ применяется до сих пор. В ней учитыва-

ются такие классические клинко-морфологические факторы прогноза, как глубина инвазии в миометрий, распространение опухоли на шейку матки, метастазы в яичники, тазовые и поясничные лимфатические узлы, поражение органов малого таза, наличие опухолевых клеток в смывах из брюшной полости и отдаленных метастазов [34; 45; 47]. Определение стадии РТМ на основании клинических данных и результатов раздельного диагностического выскабливания полости матки в настоящее время проводится только тем больным, у которых хирургическое лечение невозможно [1; 4; 6; 8].

Точное хирургическое определение стадии рака эндометрия чрезвычайно важно для планирования адекватного лечения. Даже после выполнения радикальных операций возможно прогрессирование заболевания и смерть ряда пациентов. С повышением стадии заболевания закономерно возрастает частота рецидивирования, и сокращаются сроки до прогрессирования [1; 2; 4]. Также на высокий риск развития рецидива указывают некоторые прогностически неблагоприятные варианты гистологического строения опухоли (светлоклеточный, серозно-папиллярный раки), низкая степень дифференцировки опухоли, переход опухоли на шейку матки, глубокая инвазия в миометрий (> 1/2 толщины), метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов и размеры опухоли более 4 см. Менее значимы и реже используются такие показатели, как уровень рецепторов эстрогенов и прогестерона в опухоли, результаты проточной цитофлуориметрии с определением ploидности опухолевых клеток и экспрессия отдельных онкогенов.

Метастазы в регионарных лимфатических узлах – наиболее важный прогностический фактор при раке тела матки. Большинство исследователей доказано, что глубина инвазии опухоли в миометрий напрямую влияет на вероятность регионарного метастазирования. Чем глубже инвазия в миометрий, тем выше риск выхода опухоли за пределы матки и прогрессирования заболевания [10; 17; 19; 23–25]. При I клинической стадии метастазы в тазовых лимфатических коллекторах после операции обнаруживаются у 10 %, а в поясничные – у 6 % больных. При второй клинической стадии соответственно у 36 и 23 %. Наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах повышает риск прогрессирования РТМ в 6 раз [5]. По данным Lurian et al. прогрессирование отмечается у 48 % больных с метастазами в лимфатических узлах, в том числе у 45 % с метастазами в тазовых лимфатических узлах и у 64 % – в поясничных, и только у 8 % больных без метастазов [48]. 5-летняя БРВ составляет 54 % при наличии метастазов в лимфатических узлах и 90 % при их отсутствии [5; 35]. По данным GOG, важнейшим прогностическим фактором при раке тела матки является наличие или отсутствие метастазов в поясничные лимфатические узлы.

Важным прогностическим фактором при раке тела матки является степень дифференцировки опухолевой ткани. Так, 5-летняя БРВ составляет 92 % при высокодифференцированном, 86 % – при умереннодифференцированном и 64 % – при низкодифференцированном раке тела матки I стадии [48]. Аналогичные данные приводят и другие авторы. Так, Sutton et al. наблюдали прогрессирование у 9 % больных высоко- и умереннодифференцированным и у 39 % – низкодифференцированным раком тела матки (1989 г.) [49]. Низкодифференцированные опухоли обычно характеризуются более глубокой инвазией в миометрий и частым переходом на шейку матки. Помимо того, у этой категории больных чаще наблюдаются лимфогенные и гематогенные метастазы.

В отсутствие инвазии в миометрий метастазы в тазовые лимфатические узлы наблюдаются только у 1 % больных, а при инвазии в наружную треть миометрия – у 25 %, причем у 17 % имеются метастазы в поясничные лимфатические узлы [17]. В отсутствие инвазии или при поверхностном распространении опухоли в пределах эндометрия 5-летняя выживаемость составляет 80–90 %, а при глубокой инвазии – только 60 %. Ряд авторов отмечают, что в оценке прогностической ценности инвазии в миометрий важную роль играет такой показатель, как минимальное расстояние от опухоли до серозной оболочки матки. Показано, что риск прогрессирования и летальных исходов значительно выше, если оно меньше 5 мм [50].

На дооперационном этапе подробную информацию об уровне инвазии опухоли в миометрий может дать УЗКТ с использованием трансабдоминального и трансвагинального доступов и доплерометрии. В последнее время получает свое развитие метод цветового и энергетического доплеровского картирования с использованием трехмерной реконструкции, с помощью которой можно определить не только глубину инвазии, но и точный объем опухолевой ткани, редко имеющей правильную форму. Также подобную информацию можно получить при РКТ малого таза, так как эти методы являются на сегодняшний день наиболее информативными и взаимодополняющими. Однако обе они имеют весьма невысокую чувствительность и спе-

цифичность при определении раннего метастазирования в регионарные лимфатические коллекторы, в то время как метастазы в лимфатических узлах являются наиболее важным прогностическим фактором. У больных с диагнозом РТМ чувствительность УЗКТ при оценке состояния тазовых лимфатических узлов составляет не более 48 %. Трудность исследования подвздошных и парааортальных лимфатических коллекторов с помощью УЗКТ объяснима не только пределами чувствительности метода, но и анатомической труднодоступностью данной зоны для УЗИ. Часто возникает интерпозиция петель кишечника, содержащего газ, нередко проявления метаболического синдрома, которым в различной степени страдают более 80 % больных раком эндометрия. РКТ и МРТ в последние годы также являются уточняющими методами диагностики, так как не позволяют стопроцентной точностью установить метастатическое поражение лимфатических узлов [2]. Ни один из неинвазивных методов диагностики не может установить поражение тазовых и поясничных лимфатических узлов микрометастазами при РТМ. Пункционная биопсия увеличенных тазовых лимфатических узлов под контролем УЗИ или других методов визуализации на дооперационном этапе используется редко из-за анатомической труднодоступности подвздошных областей для пункции, частой интерпозиции петель кишечника, сосудов брыжейки и сопряженных с данной манипуляцией высокой вероятности осложнений.

Таким образом, единственным методом хирургического стадирования и точной оценки состояния регионарного лимфатического аппарата является биопсия тазовых и поясничных лимфатических узлов. Полученная после исследования информация чрезвычайно важна для правильного выбора дальнейшей тактики лечения больной.

Тазовая и парааортальная лимфаденэктомия до настоящего времени не является стандартом хирургического лечения при раке эндометрия, даже у пациенток с высоким риском появления регионарных метастазов [40]. Объем хирургического вмешательства в каждом случае выбирается индивидуально. На решение о выборе объема операции влияет не только наличие факторов, увеличивающих возможность регионарного метастазирования, но и анатомические особенности больных вследствие выраженных эндокринно-обменных нарушений.

В 1988 г. FIGO предложил выполнять больным с диагнозом «РТМ» биопсию тазовых и парааортальных лимфатических узлов во время хирургического вмешательства, но, несмотря на это, мнения врачей расходятся до сих пор, и полная процедура хирургического стадирования выполняется редко. Многие авторы склоняются к необходимости полного удаления тазовых и парааортальных лимфатических коллекторов [14; 32; 38; 44; 46], в то время как другие обоснованно сомневаются в пользе данного объема операции при ранних стадиях процесса, когда риск метастазирования низок, например при высокодифференцированной опухоли, прорастающей миометрий менее чем на 2/3 толщины [21]. Также многие авторы считают лимфаденэктомию нецелесообразной при G₁ вне зависимости от стадии [29] и при I стадии вне зависимости от степени дифференцировки опухоли [15]. Имеется точка зрения, согласно которой нет необходимости в выполнении лимфаденэктомии пациенткам с высокой степенью риска метастазирования, так как все равно в послеоперационном периоде им будет проведена лучевая терапия вне зависимости от наличия или отсутствия поражения регионарных лимфатических узлов, как например, при II стадии заболевания [22].

Некоторые авторы рекомендуют выполнение биопсии тазовых лимфатических узлов или выполнение биопсии только в случае обнаружения увеличенных лимфатических узлов [28]. В мировой литературе на сегодняшний день нет единого подхода и показаний к выполнению лимфодиссекции при РТМ, кроме того, нет четких показаний к парааортальной лимфаденэктомии. Основным критерием в большинстве случаев служит дифференцировка опухоли. В США пациенткам с I, II и III стадией РТМ лимфаденэктомия выполняется соответственно в 27; 68 и 90 % случаев, причем парааортальная лимфодиссекция выполняется, как минимум 12 % пациенток с аденокарциномой высокой степени дифференцировки (G_1) и до 96 % при глубокой инвазии в миометрий и умеренно- или низкодифференцированной аденокарциномой (G_2 , G_3). Вторым по важности показанием к лимфаденэктомии в США является глубина опухолевой инвазии в миометрий, особенно для высоко- и умереннодифференцированных опухолей. Иная ситуация складывается в Европе, где в крупных центрах лимфодиссекция при РТМ практикуется менее широко и применяется только в случаях с низкодифференцированной опухолью (G_3), глубокой опухолевой инвазией в миометрий и клинически определяемом поражении тазовых лимфатических узлов [36]. В России на сегодняшний день показаниями к расширенной экстирпации матки с придатками в отсутствие клинически определяемых регионарных метастазов, являются факторы, указывающие на высокий риск лимфогенной диссеминации. При данной операции выполняется тотальная лимфаденэктомия, включающая двухстороннее удаление общих, наружных, внутренних подвздошных и obturatorных лимфатических узлов с окружающей клетчаткой таза единым блоком, при необходимости удаляют поясничные лимфатические узлы. Факторами, указывающими на высокий риск лимфогенной диссеминации, являются: светлоклеточный, серозно-папиллярный рак эндометрия, низкая степень дифференцировки опухоли, переход опухоли на шейку матки, ультразвуковые признаки глубокой инвазии в миометрий ($> 1/2$), метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов и размеры опухоли более 4 см. Но данные факторы устанавливаются на дооперационном этапе. И практика демонстрирует неудовлетворительные результаты при этой тактике, так как при гистологическом исследовании операционного материала от больных, перенесших РЭМП, верификация поражения регионарных лимфатических узлов имеет место только в 27 % случаев. Следовательно, в 73 % случаев можно было не выполнять РЭМП, а ограничиться стандартной экстирпацией, учитывая тот факт, что общая частота всех осложнений после РЭМП у больных РТМ составляет примерно 20 % и около 6 % осложнений из них являются тяжелыми [37].

На сегодняшний день большинство авторов склоняются к тому, что селективная лимфаденэктомия достаточна для оценки состояния лимфатических узлов [18; 30; 37]. Современные научно-технические достижения в онкохирургии и в частности – в онкогинекологии позволяют выполнить радикальную операцию при РТМ лапароскопически, используя для этого все преимущества данного метода, в сочетании с биопсией регионарных лимфоколлекторов с целью полноценного хирургического стадирования. Данной проблеме в мировой литературе посвящено множество работ. Исторически переход от лапаротомных операций при раннем РТМ к лапароскопически-ассистированным и далее к полноценным лапароскопиче-

ским произошел в 1993–1994 гг. M. Canis, G. Mage et al. в 1994 г. сообщают, что больным РТМ ранних стадий может быть с успехом выполнена лапароскопическая лимфаденэктомия. Авторы предлагают рассмотреть данную методику в качестве стандартного метода хирургического стадирования РТМ. Кроме того, авторы сообщают о том, что у них уже имеется опыт радикальных лапароскопических гистерэктомий в сочетании с одномоментной парааортальной лимфодиссекцией и по поводу РТМ [20].

R.R. Barakat, G. Lev et al. [13] (США) в 2007 г. сообщали о 12-летнем опыте ведения пациенток, страдающих раком тела матки, и об изменениях, произошедших в принципах лечения этих женщин за указанное время. Начиная с января 1991 г. по декабрь 2004 г. в исследование включено 1312 пациенток, получивших хирургическое лечение – открытую абдоминальную или лапароскопическую гистерэктомию с двухсторонней тубовариэктимией. Тазовая и парааортальная лимфодиссекция выполнялась пациенткам с высоким риском регионарного метастазирования. Данный риск оценивался индивидуально. Далее пациентки с высоким риском рецидивирования получали дистанционную лучевую терапию с или без трансвагинальной внутриматочной лучевой терапии. Авторы говорят о значительно возросшей доле лапароскопических операций начиная с 2001 г., когда клиника стала принимать непосредственное участие в национальном рандомизированном исследовании «лапароскопия в сравнении с абдоминальной хирургией», и о полноценном хирургическом стадировании с помощью видеохирургии. Значительно увеличилось как число пациенток, подвергшихся тазовой и парааортальной лимфодиссекции, так и среднее число удаленных у них лимфатических узлов. К тому же в этой связи значительно уменьшилось использование дистанционной лучевой терапии. За все периоды наблюдения нет значительной разницы в 1, 2 и 5-летней выживаемости. В заключение авторы говорят об изменениях, базирующихся, главным образом, на значительном увеличении доли выполняемых лапароскопических операций с исчерпывающим хирургическим стадированием. Это позволило снизить показания к послеоперационной лучевой терапии без негативного влияния на общую выживаемость.

Следует отметить, что в России до настоящего времени лапароскопическая хирургия не нашла широкого применения в онкогинекологии. Использование лапароскопической хирургии в онкогинекологии ограничено в связи с вероятным увеличением риска диссеминации опухоли. Действительно, при несоблюдении правил асептики в ходе выполнения лапароскопической операции, как и при обычном хирургическом вмешательстве, возникают метастазы в передней брюшной стенке в местах введения троакаров (G. Lane).

Однако по мнению многих авторов (D. Querleu, E. Surwit, J. Childers) надежность лапароскопического доступа при выполнении лимфаденэктомии у онкогинекологических больных не уступает таковой при чревосечении при условии выполнения операции опытным хирургом-эндоскопистом, владеющим традиционными хирургическими доступами, и соблюдении основных принципов онкохирургии.

Так, в ходе выполнения лапароскопической лимфаденэктомии все удаленные лимфатические узлы вне зависимости от наличия или отсутствия признаков их опухолевого поражения должны быть асептически извлечены из брюшной полости без контакта с передней брюшной стенкой.

С этой целью используются эндоскопические пластиковые контейнеры «specimen bag», которые изолируют удаленные лимфатические узлы, 10 мм или 12 мм троакары, а также специальный эндоскопический инструмент – целиозэкстрактор (D. Dargent).

При лапароскопической экстирпации матки с придатками по поводу рака эндометрия в ходе операции для создания правильной экспозиции и обеспечения хирургического доступа используются различные маточные манипуляторы, конструкция которых предполагает введение наконечника манипулятора в полость матки.

Группа американских ученых – G.H. Eltabbakh, S.L. Mount et al. (2005) – доказала, что использование данных манипуляторов не повышает частоту выявления опухолевых клеток в цитологических смывах с брюшной полости и не влияет на процесс диссеминации опухоли [25; 27].

Ранее, в 2001 г., эта же группа ученых провела исследование, в котором сравнила 2 группы больных ранними стадиями РТМ. Первой (проспективной) группе по поводу данного заболевания выполнена лапароскопическая ЭМП с подвздошной селективной лимфаденэктомией (86 пациенток). Вторая группа (ретроспективная) была контрольной и состояла из 57 пациенток, перенесших тот же объем операции лапаротомным доступом.

Отдаленные результаты в обеих группах прослеживались более двух лет. Проспективная группа отличалась от контрольной меньшим индексом массы тела, но большим временем операции. В результате данного исследования сделаны научно обоснованные выводы о том, что подавляющее большинство женщин (более 90 %) с ранней стадией РТМ могут быть оперированы лапароскопически с лучшими результатами, чем при лапаротомии.

Преимущества следующие: достоверно меньшее количество интра- и послеоперационных осложнений при большем количестве удаленных лимфатических узлов (что делает результат хирургического стадирования более точным), меньшее снижение гематокрита в послеоперационном периоде, значительно менее выраженный послеоперационный болевой синдром и связанное с этим более редкое применение анальгетиков, более короткий реабилитационный период, меньшие сроки госпитализации, быстрое возвращение к трудовой деятельности и несравнимо лучший косметический эффект. В целом, все эти факторы, связанные с выбором лапароскопической операции, значительно повышают качество жизни у данной категории пациенток [25].

В исследовании, проведенном с 1996 по 2005 гг. J. L. Walker, M. Piedmonte et al. [43], при сравнении лапаротомной и лапароскопической методик хирургического стадирования РТМ доказано, что эти методы имеют одинаковую диагностическую ценность.

Лапароскопическое хирургическое стадирование рака эндометрия может быть выполнено в 76,3 % случаев. Нет различия в результатах цитологического исследования смывов с брюшной полости, частоты выявленного поражения лимфатических узлов и соответственно FIGO стадирования при лапароскопии в сравнении с лапаротомией. По данным литературы, количество удаленных лимфатических узлов при лапароскопических операциях и операциях, выполненных абдоминальным доступом, значительно не различается [16]. Также доказано, что переход к лапаротомии от лапароскопии оправдан и может быть легко выполнен, в том случае, если есть технические трудности для выполнения полноценного хирургического стадирования лапароскопическим доступом.

Исследование L. N. Abaid, J. Boggess [11] демонстрирует сравнение коэффициента «цена – эффективность» для лапаротомного и лапароскопического хирургического лечения РТМ, основываясь на показателях смертности, интраоперационных осложнений (ранения прямой кишки, мочевого пузыря, сосудов и интраоперационные кровотечения), частоте глубоких венозных тромбозов, частоте переливания крови и продолжительности госпитализации.

Авторами доказано, что при одинаковой эффективности общая цена хирургического лечения оказалась ниже для лапароскопической методики, причем на цену более всего повлияла продолжительность нахождения больной в стационаре, которая для лапароскопии оказалась в 3 раза короче, чем для лапаротомии.

Основной вопрос, волнующий клиницистов – выживаемость больных РТМ после радикальной лапароскопической операции в сравнении с выживаемостью больных, перенесших открытую операцию.

Так, G.H. Eltabbakh et al. (США) в 2002 г. в своем исследовании публикуют данные о 5-летней выживаемости 2 групп больных ранними стадиями РТМ и одинаковым объемом операции – экстирпации матки с придатками с биопсией тазовых лимфатических узлов. В первую группу было включено 100 больных РТМ, оперированных лапароскопически, во вторую 86 больных, оперированных лапаротомным доступом.

Данные группы не имели значительных отличий в возрасте, менопаузальном статусе, хирургической стадии, объеме лимфаденэктомии и уровне дифференцировки опухоли. В результате доказано, что БРВ и ОВ больных этих групп значительно не различаются. Для женщин, перенесших лапароскопическую операцию, 2- и 5-летняя БРВ составила соответственно 93 и 90 %, а для женщин, оперированных лапаротомным доступом 94 и 92 %. Показатели общей выживаемости составили: для лапароскопического метода 2- и 5-летняя 98 и 92 % соответственно, для лапаротомии – 96 и 92 %. Таким образом, автор утверждает, что результаты хирургического лечения женщин с диагнозом РТМ при применении лапароскопического метода не хуже и сопоставимы с результатами «открытой» хирургии [26].

Подобное же исследование провела другая группа авторов [39] в 2008 г. Целью было сравнение выживаемости после лапароскопических операций с таковой после хирургических вмешательств, выполненных лапаротомно, больным РТМ I и II клинических стадий.

В первую группу было включено 67 женщин, оперированных лапароскопически (проспективный материал), во вторую 127 больных, оперированных традиционным лапаротомным доступом (ретроспективный материал).

Осложнения в этих группах больных были сопоставимы и значительно не различались по тяжести и частоте возникновения, в то время как в первой группе период госпитализации был значительно короче и отмечено достоверно меньшее количество инфекционных осложнений.

Для первой группы 2- и 5-летняя БРВ составила соответственно 93 и 91,7 %, а для женщин, оперированных лапаротомным доступом – 88,5 и 85 %. Показатели ОВ составили: для лапароскопического метода 2- и 5-летняя 100 и 99,2 % соответственно, для лапаротомии – 100 и 97 %.

В заключение авторы также говорят о том, что анализ выживаемости при сравнении этих групп не показывает значительных различий [39].

Корейские клиницисты [33] в исследовании, посвященном сравнению результатов после лапароскопической операции с результатами после лапаротомных операций у больных РТМ I и II стадий, получили схожие данные о трехлетней выживаемости. Итак, в группе больных, оперированных лапаротомно (168) 3-летняя БРВ составила 98,6 %; для лапароскопии (79 наблюдений) – 97,5 %. Таким образом, не отмечено статистически значимых различий по безрецидивной выживаемости. Также в заключение авторы не отмечают статистически значимых различий в кровопотере, частоте переливания крови, времени операции, в то время как число удаленных лимфатических узлов при лапароскопии было больше, чем при лапаротомии, а время госпитализации значительно короче [33].

Польские клиницисты [41] в 2005 г. также провели подобное исследование, сравнив две группы больных РТМ I стадии. 45 больных, оперированных лапароскопически, было включено в первую группу, 136 больных, оперированных лапаротомно – во вторую. При сравнении результатов частота рецидивов в первой группе составила 6 %, во второй – 13 %. Авторы не отметили статистически значимых различий в 3-летней БРВ, сделав заключение о том, что лапароскопическая операция при РТМ не ухудшает прогноз и безрецидивную выживаемость при меньшей инвазивности и значительно более коротком послеоперационном периоде [41].

Итальянские клиницисты [42] публикуют в 2006 году данные исследования «Лапароскопическое лечение рака эндометрия: возможность выполнения и результаты», где также проводят сравнительный статистический анализ двух групп больных РТМ I–III стадий. Первая группа (36 пациенток) – больные, оперированные лапаротомно. Вторая (41 женщина) – больные, оперированные лапароскопически. Индекс массы тела был значительно выше у женщин во второй группе (27,3 и 24,6; $p = 0,001$). Время операции во второй группе было больше (143,6 мин против 109,7 мин; $p = 0,0001$). Послеоперационный период был значительно больше в первой группе (4,59 дня против 3,18 дня; $p = 0,0001$). Группы статистически значимо не отличались по объему операционной кровопотери, осложнениям, а главное, общей и безрецидивной 3- и 5-летней выживаемости [42].

Испанские врачи [30], также в 2006 г. опубликовали результаты своего ретроспективного нерандомизированного клинического исследования, посвященного сравнению результатов лечения пациенток РТМ I клинической стадии. В итоге сравнение результатов лечения проспективной группы больных, оперированных лапароскопически (55 человек), и ретроспективной группы (370 человек), оперированных лапаротомным доступом (январь 1995 года – июнь 2001 года), показало, что при сопоставимых клинических характеристиках, в том числе патологоанатомических характеристиках опухоли, кровопотеря, а вместе с ней и потребность в переливании компонентов крови были значительно меньше в проспективной группе, но время операции было больше. Удаление тазовых лимфатических узлов (селективная биопсия) с целью полноценного хирургического стадирования выполнено в 91,4 % случаев, удаление парааортальных лимфатических узлов – 49,7 % пациенток. При сравнении полученных результатов в отношении количества удаленных лимфатических узлов в проспективной и ретроспективной группах авторы получили следующие результаты: количество удаленных лимфатических узлов в группе больных, оперированных лапароскопически, было значительно больше, чем в

ретроспективной группе ($p = 0,001$). Медиана наблюдения составила 38,1 мес. Сравнения по общей и безрецидивной выживаемости не проводились. Авторы пришли к следующим выводам: лапароскопическая радикальная операция (гистерэктомия и двухсторонняя сальпингоофорэктомия), выполняемая вместе с биопсией регионарных лимфатических узлов (и тазовых, и парааортальных) с целью полноценного хирургического стадирования, выполняема у больных РТМ ранних клинических стадий и соответствует хирургическим онкологическим принципам при меньшем сроке послеоперационной реабилитации, меньшей послеоперационной болезненности и более коротких сроках госпитализации, чем у больных, оперированных лапаротомно [30]. Следующий этап развития хирургического лечения и стадирования РТМ подразумевает совместное использование нескольких методик и современных научно-технических решений. Ярким примером является использование лапароскопической хирургии в сочетании с обнаружением сторожевых лимфатических узлов при помощи лимфосцинтиграфии и/или интраоперационного использования специального красителя. Так P. Dzvincuk et al. (2006 г.) [24] приводят данные о использовании ^{99m}Tc -наноколлоида для определения сторожевых регионарных лимфатических узлов в пре- и интраоперационном периоде у больных с диагнозом РТМ. Препарат вводился длинной иглой трансцервикально в миометрий. Далее в промежутке времени от 20 до 90 мин после введения препарата в процессе его распределения в тканях и сосудах выполнялась серия лимфосцинтиграмм, на которых было визуализировано распространение РФП с возможным его накоплением в пораженных лимфатических узлах. Хирургическое вмешательство выполняли через 2 часа после введения ^{99m}Tc -наноколлоида. Интраоперационно также выполнялось обнаружение радиоактивных лимфатических узлов, которые удаляли отдельно.

По результатам исследования «сторожевой» узел был обнаружен в 79 % случаев. 15,3 % из всех удаленных лимфатических узлов были положительными в плане накопления радиофармпрепарата (при этом 33 % сторожевых лимфатических узлов располагались парааортально) и при гистологическом исследовании этих лимфатических узлов в 7 % случаев выявлено метастатическое поражение. Все пораженные метастазами лимфатические узлы накапливали радиофармпрепарат.

Abu-Rustum N.R., Khoury-Collado F. et al. в 2009 г. публикуют результаты своего проспективного нерандомизированного исследования, целью которого также являлось обнаружить сторожевые лимфатические узлы у больных РТМ I клинической стадии. Для этого авторы применили сочетание двух методов обнаружения этих лимфатических узлов.

Всем пациенткам либо за день до, либо в день операции выполняли лимфосцинтиграфию с введением ^{99m}Tc -наноколлоида в миометрий; также интраоперационно глубоко в шейку матки или в шейку и в дно матки вводили метиленовый синий краситель или изосульфат. Всем пациенткам выполнена гистерэктомия с двухсторонней сальпингоофорэктомией в сочетании с удалением регионарных лимфатических узлов. «Горячие» (при ранее выполненной лимфосцинтиграфии) или окрашенные синим красителем интраоперационно лимфатические узлы отдельно маркировались и направлялись на гистологическое исследование. 42 пациентки были включены в исследование с марта 2006 г. по август 2008. 25 (60 %) оперированы лапароскопически и 17 (40 %) лапаротомно.

«Сторожевые» лимфатические узлы обнаружены дооперационно у 30 (71 %) при помощи лимфосцинтиграфии и интраоперационно 36 (86 %) при окрашивании синим красителем. У каждой пациентки в среднем исследовано 3 (от 1 до 14) позитивных и 14,5 (от 4 до 55) непозитивных лимфатических узлов.

Таким образом, у 100 % женщин были найдены «сторожевые» лимфатические узлы. У 4 пациенток именно сторожевые лимфатические узлы при гистологическом исследовании оказались поражены метастазами. Ложно-негативных случаев не было [12].

Подобное сочетание методик позволяет радикально выполнить операцию и удалить минимальное количество лимфатических узлов (сторожевых), чтобы свести к абсолютному минимуму хирургическое вмешательство, а вместе с тем и возможность возникновения интра- и послеоперационных осложнений.

Литература

1. Бохман Я.В. Руководство по онкогинекологии. – СПб.: «ООО Издательство Фолиант», 2002. – 542с.: ил.
2. Давыдов М.И., Баранов В.В. Злокачественные опухоли тела матки. – Энциклопедия клинической онкологии. – М., 2004.
3. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Заболеваемость злокачественными новообразованиями населения России и стран СНГ // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2008. – Т. 19, №2 (прил. 1).
4. Кузнецов В.В., Нечушкина В.М., Хирургическое лечение рака тела матки // Практическая онкология. – 2004. – Т. 5, № 1. – С. 25.
5. Ларэйн Дж., Берек Дж., Адаши И. Гинекология по Эмилю Новаку. – М., 2002.
6. Лекции по онкогинекологии / Под редакцией академика РАН и РАМН, профессора М.И. Давыдова, профессора В.В. Кузнецова. – М.: «МЕДпресс-информ», 2009. – С. 226–54.
7. Мерабишвили В.М. Злокачественные новообразования в Санкт-Петербурге. – СПб., 2001. – 219 с.
8. Опухоли женской репродуктивной системы / Под редакцией академика РАН и РАМН, профессора М.И. Давыдова, профессора В.П. Летагина и профессора В.В. Кузнецова. – М., 2007. – С. 228–54.
9. Чиссов В.И., Старинский В.В., Ременник Л.В. Злокачественные новообразования в России накануне XXI века как медицинская и социальная проблема // Рос. онкол. журн. – 1998. – №3. – С. 820.
10. Aalders J. et al. Postoperative external irradiation and prognostic parameters in stage I endometrial carcinoma // Obstet. Gynecol. – 1980. – Vol. 56. – P. 419–446.
11. Abaid L. N., Boggess J., Wu J. Laparoscopic treatment of endometrial cancer: A cost-effectiveness analysis. University of North Carolina, Chapel Hill, NC, 2005.
12. Abu-Rustum N.R., Khoury-Collado F., Pandit-Taskar N. et al. Sentinel lymph node mapping for grade 1 endometrial cancer: is it the answer to the surgical staging dilemma? // Gynecol Oncol. – 2009. – Vol. 113(2). – P. 163–9.
13. Barakat R.R., Lev G., Hummer A.J. et al. Twelve-year experience in the management of endometrial cancer: a change in surgical and postoperative radiation approaches // Gynecol Oncol. – 2007. – Vol. 105(1). – P. 150–6.
14. Borens M.N., Kilgore L.C. Complete surgical staging of early endometrial carcinoma: optimizing patient outcome // Semin. Radiat. Oncol. – 2000. – Vol. 10. – P. 3–7.
15. Belinson J.L., Lee K.R., Badger G.J. et al. Clinical stage I adenocarcinoma of the endometrium: analysis of recurrences and the potential benefit of staging lymphadenectomy // Gynecol Oncol. – 1992. – Vol. 44. – P. 17–23.
16. Boike G., Lurain J., Burke J. A comparison of laparoscopic management of endometrial cancer with traditional laparotomy // Gynecol. Oncol. – 1994. – Vol. 52. – P. 105.
17. Boronow R. C. et al. Surgical staging in endometrial cancer clinical-pathologic findings of a prospective study // Obstet. Gynecol. – 1984. – Vol. 63. – P. 825–32.
18. Burke T.W., Eifel P.J., Muggia F.M. Cancer of the uterine body. – Cancer: Principles and Practice of Oncology (6 edition). – Lippincott Williams and Wilkins, 2001.
19. Bucy G.S. et al. Clinical stage I and II endometrial carcinoma treated with surgery and/or radiation therapy: analysis of prognostic and treatment related factors // Gynecol. Oncol. – 1989. – Vol. 33. – P. 290–205.
20. Canis M., Mage G., Wattiez A. et al. The role of laparoscopic surgery in gynecologic oncology // Curr. Opin. Obstet. Gynecol. – 1994. – Vol. 6(3). – P. 210–4.
21. Creasman W.L. Limited disease: role of surgery // Semin Oncol. – 1994. – Vol. 21. – P. 79–83.
22. Descamps P., Body G., Calais G. et al. Stage I and II endometrial cancer, should lymphadenectomy still be done? // J Gynecol Obstet Biol Reprod. – 2005. – Vol. 24. – P. 794–801.
23. Di Saia P.J., Creasman W.T. Clinical Gynecologic Oncology. – St. Louis M.O.: Mosby C.V., 1992.

Заключение

Обзор специальной медицинской научной литературы позволяет утверждать, что основным методом лечения рака эндометрия является хирургический в объеме экстрафасциальной экстирпации матки с придатками. В настоящий момент широко обсуждается вопрос о необходимости, объеме и способе выполнения регионарной лимфаденэктомии. Видеохирургия со всеми ее преимуществами может стать не просто альтернативной методикой, а стандартом для выполнения радикальных операций при РТМ пациенткам с ранними стадиями заболевания и отсутствием абсолютных противопоказаний к видеохирургическому вмешательству. Точное определение морфологической стадии заболевания позволит более четко определить показания к адъювантному лечению и установить прогноз. Исследования в этой области продолжаются.

24. Dzvincuk P., Pilka R., Kudela M. Sentinel lymph node detection using 99mTc-nanocolloid in endometrial cancer // *Peska Gynecol.* – 2006. – Vol. 71(3). – P. 231–6.
25. Eltabbakh G.H., Shamonki M.I., Moody J.M., Garafano L.L. Laparoscopy as the primary modality for the treatment of women with endometrial carcinoma // *Cancer.* – 2001. – Vol. 91(2). – P. 378–87.
26. Eltabbakh G.H. Analysis of survival after laparoscopy in women with endometrial carcinoma // *Cancer.* – 2002. – Vol. 95(9). – P. 1894–901.
27. Eltabbakh G.H., Mount S.L. Laparoscopic surgery does not increase the positive peritoneal cytology among women with endometrial carcinoma // *Gynecol Oncol.* – 2006. – Vol. 100(2). – P. 361–4.
28. Faught W., Krepert G.V., Lotocki R. et al. Should selective paraaortic lymphadenectomy be part of surgical staging for endometrial cancer // *Gynecol Oncol.* – 1994. – Vol. 55. – P. 51–5.
29. Geisler J.P., Wicmann M.C., Zhou Z. et al. Using FIGO histologic grade to determine when to perform lymphadenectomy in endometrioid adenocarcinoma of the endometrium // *Eur J Gynecol Oncol.* – 1996. – Vol. 17. – P. 204–7.
30. Gil-Moreno A., Díaz-Feijoo B., Morchón S., Xercavins J. Analysis of survival after laparoscopic-assisted vaginal hysterectomy compared with the conventional abdominal approach for early-stage endometrial carcinoma: a review of the literature // *J. Minim. Invasive Gynecol.* – 2006. – Vol. 13(1). – P. 26–35.
31. Herbst A.L. Neoplastic diseases of the uterus. – *Comprehensive gynecology* / Eds. Droegemueller W., Herbst A.L. – Louis: Mosby, 1992. – Ch.28. – P. 800–32.
32. Homesley H.B., Zaino R. Endometrial cancer: prognostic factors // *Semin Oncol.* – 1994. – Vol. 21. – P. 71–8.
33. Kim D.Y., Kim M.K., Kim J.H. et al. Laparoscopic-assisted vaginal hysterectomy versus abdominal hysterectomy in patients with stage I and II endometrial cancer // *Int J Gynecol Cancer.* – 2005. – Vol. 15(5). – P. 932–7.
34. Lanciano R.M., Corn B.W., Schuster D.J. The justification for a surgical staging system in endometrial carcinoma // *Radiother Oncol.* – 1993. – Vol. 28. – P. 189–96.
35. Lurain J.R. et al. Prognostic factors associated with recurrence in clinical stage I adenocarcinoma of the endometrium // *Obstet. Gynecol.* – 1991. – Vol. 78. – P. 63–9.
36. Maggino T., Roniagnolo C., Zola P. et al. An analysis of approaches to the treatment of endometrial cancer in Western Europe: a CTF study // *Eur J Cancer.* – 1995. – Vol. 31A. – P. 1993–7.
37. Maggino T. et al. An analysis of approaches to the management of endometrial cancer in North America: a CTF study // *Gynecol Oncol.* – 1998. – Vol. 68. – P. 274–270.
38. Mikuta J.J. Preoperative evaluation and staging of endometrial cancer. // *Cancer.* – 1995. – Vol. 76. – P. 2041–3.
39. Nezhat F., Yadav J., Rahaman J. et al. Analysis of survival after laparoscopic management of endometrial cancer // *J. Minim. Invasive Gynecol.* – 2008. – Vol. 15(2). – P. 181–7.
40. Podratz K.S., Mariani A., Webb M.J. Staging and therapeutic value of lymphadenectomy in endometrial cancer // *Gynecol. Oncol.* – 1998. – Vol. 70. – P. 163–4.
41. Sobiczewski P., Bidzinski M., Derlatka P. et al. Comparison of the results of surgical treatment using laparoscopy and laparotomy in patients with endometrial cancer // *Int. J. Gynecol. Cancer.* – 2005. – Vol. 15(5). – P. 946–51.
42. Volpi E., Ferrero A., Jacomuzzi M.E. et al. Laparoscopic treatment of endometrial cancer: feasibility and results // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2006. – Vol. 124(2). – P. 232–6.
43. Walker J.L., Piedmonte M., Spirtos N. et al. Surgical staging of uterine cancer: Randomized phase III trial of laparoscopy vs laparotomy. – A Gynecologic Oncology Group Study (GOG): Preliminary results. Oklahoma Univ. of Health Sci Ctr, Oklahoma City, OK; GOG Statistical and Data Center, Buffalo, NY; University of Nevada, Las Vegas, NV; Encino-Tarzana Regional Medical Center, Tarzana, CA; Pacific Gynecologic Specialists, Pasadena, CA; University of Oklahoma, Oklahoma City, OK; St. Thomas Hospital, London, United Kingdom. 2005.
44. Wolfson A.H. et al. The prognostic significance of surgical staging for carcinoma of the endometrium // *Gynecol. Oncol.* – 1992. – Vol. 45. – P. 142–6.
45. Wolfson A.H., Sighler S.E., Markoe A.M. et al. The prognostic significance of surgical staging for carcinoma of endometrium // *Gynecol. Oncol.* – 1992. – Vol. 45. – P. 142–6.
46. Yokoyama Y., Maruyama H., Sato S., Saito Y. Indispensability of pelvic and paraaortic lymphadenectomy in endometrial cancers // *Gynecol. Oncol.* – 1997. – Vol. 64. – P. 411–7.
47. Zaino R.J., Kurman R.J., Diana K.L. et al. The utility of the revised International Federation of Gynecology and Obstetrics histological grading of endometrial adenocarcinoma using a defined nuclear grading system: A Gynecologic Oncology Group Study // *Cancer.* – 1995. – Vol. 75. – P. 81–6.
48. Lurain J.R. et al. Prognostic factors associated with recurrence in clinical stage I adenocarcinoma of the endometrium // *Obstet. Gynecol.* – 1991. – Vol. 78. – P. 63–9.
49. Sutton G. P. et al. Features associated with survival and disease-free survival in early endometrial cancer // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1989. – Vol. 160. – P. 1385–93.
50. Kaku T. et al. Reassessment of myometrial invasion in endometrial carcinoma // *Obstet. Gynecol.* – 1994. – Vol. 84. – P. 979–82.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ» (окончание)

В подписях под рисунками должны быть объяснены все кривые, буквенные, цифровые и другие условные обозначения. В подписях под микрофотографиями следует указать методику микроскопии, увеличение, метод окраски материала. Если иллюстрация заимствуется из другого источника, в конце подписи следует дать на него ссылку. На печатном экземпляре рисунки нумеруют, помечают верх и низ.

Все формулы должны быть тщательно выверены автором, набраны или встроены в формат текстового редактора. В формулах необходимо различать строчные и прописные, латинские и греческие, подстрочные и надстрочные буквы. Используемые автором сокращения должны быть разъяснены под формулой.

Список литературы должен быть кратким и содержать не более 20 ссылок для статей, посвященных экспериментальным и клиническим исследованиям, и не более 100 ссылок для обзорных статей. Номера ссылок указывается в квадратных скобках через точку с запятой.

В списке литературы в алфавитном порядке перечисляются курсивом *фамилии и инициалы авторов* на русском языке, затем на иностранных языках. Все библиографические ссылки в тексте должны быть пронумерованы в соответствии с их положением в списке литературы. Фамилии иностранных авторов приводятся в оригинальной транскрипции. В список литературы не включаются ссылки на неопубликованные работы и учебники. Ссылки должны быть тщательно выверены авторами, которые несут ответственность за правильность приведенных данных.

Если авторов не более четырех, они упоминаются все, при большем числе авторов перечисляются первые три, далее пишется *и др.* или *et. al.* При ссылке на книгу следует указывать авторов, затем название книги, номер издания, издательство (может отсутствовать), год и страницы (если автор ссылается на всю книгу, то пишется 150 с., если на ее часть, то указывается С. 143-8.), например:

Руководство по гематологии под ред. А.И. Воробьева. – Т. 2. – М.: Ньюдиамед, 2004. – 277 с.

Bihrl R., Libertino J.A. Renal cell cancer with extension into the vena cava. In: Dekernion B.J., Pavone-Macaluso M. eds., Tumors of kidney. – Baltimore: Williams&Wilkins, 1986. – P. 111–123.

При ссылке на главу из книги, написанной коллективом авторов, указывают авторов главы и ее название, затем авторов или редакторов книги, название книги, номер издания (может отсутствовать), место издания, издательство (может отсутствовать), год и страницы, например:

Кэйн Д. Этические и правовые основы медицинской помощи. Берек Д., Адаши И., Хиллард П. (ред.). Гигиена по Эмилю Новаку: Пер. с англ. – М.: Практика, 2002. – С. 14-18.

При ссылке на журнал указывают авторов, затем название статьи, названию периодического издания или сборника предшествует символ // После названия журнала указывается год, том, номер выпуска, первая и последняя страницы работы, например:

Поддубная И. В., Дёмина Е. А. Диагностика и определение распространенности (стадирование) неходжкинских лимфом // Практическая онкология. – 2004. – № 3. – С. 176–184.

При ссылке на сборник статей указывают авторов, затем название статьи, сборника, место издания, год, страницы, например:

Коненко Г. А. Решение уравнений движения однофазного вязкого закрученного потока в длинной трубе. Отопление и вентиляция. – Иркутск, 1994. – С. 34–36.

При ссылке на тезисы докладов указывают авторов, затем название тезисов конференции, страницы.

При ссылке на диссертации или авторефераты указывают автора, затем название диссертации, место и дату написания, страницы. При этом используются следующие сокращения: Дис... канд. мед. наук, Дис... д-ра мед. наук, Авторефер. дис... канд. мед. наук, Авторефер. дис... д-ра мед. наук.

Ссылки на интернет-документы следует оформлять так:

Официальные периодические издания: электронный путеводитель / Рос. нац. б-ка, Центр правовой информации. [СПб.], 2005 – 2007. URL: <http://www.nlr.ru/lawcenter/izd/index.html> (дата обращения: 18.01.2007).

Логонова Л.Г. Сущность результата дополнительного образования детей // Образование: исследовано в мире: междунар. науч. пед. интернет-журн. 21.10.03. URL: <http://www.oim.ru/reader.asp?номер=366> (дата обращения: 17.04.07). Рынок тренингов Новосибирска: своя игра [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://nsk.adme.ru/news/2006/07/03/2121.html>.

В тексте рекомендуется использовать международные названия лекарственных средств, которые пишутся с маленькой буквы. Торговые названия препаратов пишутся с большой буквы. В конце статьи должны стоять подписи всех авторов. На отдельном листе авторам следует указать почтовый адрес для переписки, включающий почтовый индекс, телефон(ы), факс и адрес электронной почты.

Все статьи, поступившие в редакцию, подлежат рецензированию. Рецензенты для каждой статьи назначаются редакционной коллегией. Если рецензенты и редакторы предлагают исправить работу, то копия с таким предложением отправляется автору. Эта копия возвращается вместе с переработанным экземпляром, который представляется на бумаге и в электронном виде.

Редакция оставляет за собой право отклонить работу из-за несоответствия профилю и требованиям журнала, достоверности и объективности данных, наличия ошибок или неподкрепленных достоверными фактами деклараций, противоречащих современным научным представлениям и опыту.

Редакция журнала осуществляет научное и литературное редактирование статей, обязуется информировать авторов обо всех смысловых изменениях, возникающих при редактировании их работ (это не касается литературной правки).

Статьи, ранее опубликованные в других журналах или сборниках, не будут приняты к публикации.

С уважением,
главный редактор А.Ю. Барышников

УДК 616-006.448:615.277.3015.46:616-092.4

Т.Н. Солодянкина^{1,2}, В.И. Апанасевич²**ОШИБКИ В ДИАГНОСТИКЕ I СТАДИИ МЕЛАНОМЫ КОЖИ**¹Приморский краевой онкологический диспансер, Владивосток²Владивостокский государственный медицинский университет**Контактная информация:**

Солодянкина Татьяна Николаевна, врач-радиолог Приморского краевого онкологического диспансера, ассистент кафедры онкологии и лучевой терапии ГОУ ВПО.

Владивостокский государственный медицинский университет

адрес: Владивосток, проспект Острякова, 2; **тел.** +7(904)625-42-13**e-mail:** solotn@mail.ru

Статья поступила: 26.05.2009 г., принята к печати: 23.09.2009 г.

Резюме

Проведен анализ выживаемости пациентов с тонкими меланомами на основе данных канцер-регистра пациентов с I стадией, находящихся на диспансерном учете в Приморском краевом онкологическом диспансере с 1997 по 2005 гг. Оценивали правильность диагностики и соответствие гистологической и клинической стадии процесса. Неадекватное стадирование было выявлено в 53,7 % случаев.

Ключевые слова: меланома кожи, канцер-регистр, стадирование.T.N. Solodyankina^{1,2}, V.I. Apanasevich²**THE PROBLEMS OF FALSE-POSITIVE DIAGNOSIS IN STAGE I MELANOMA**¹Regional Oncology Dispensary, Vladivostok²The Vladivostok State Medical University**Abstract**

We have analyzed the survival of patients with stage I of thin melanoma based on the cancer-register data treated at the Vladivostok Regional Oncology Dispensary from 1997 to 2005. We have evaluated the association of diagnosis with the histological and clinical stage of disease progression. 57,3 % of diagnosis were found as false diagnosis.

Key words: melanoma, cancer-register test, stage of disease.**Введение**

Рост заболеваемости и смертности от ЗНО является одной из глобальных мировых проблем. Прирост заболеваемости ЗНО всех локализаций в 1994–2003 гг. составляет 15,8 %. Несмотря на то, что заболеваемость меланомой составляет 4,8 на 100 000 населения, темп прироста очень высок – 47,1 % за 10 лет [2]. Меланома кожи составляет приблизительно 10 % от всех опухолей кожи, но на ее долю приходится до 80 % смертельных случаев от ЗНО этой локализации [1; 5]. Вероятность заболеть в течение жизни составляет до 1 % у белого населения [4]. Теоретически раннее обнаружение должно уменьшить заболеваемость и смертность, потому что эти образования относятся к визуальным локализациям; хорошо известны факторы риска, и тонкие опухоли коррелируют с хорошей 5-летней выживаемостью [3]. Однако, как свидетельствует статистика, несмотря на то, что меланома относится к визуальным локализациям, выявляется она, как правило, когда процесс носит уже распространенный характер на местном (уровень инвазии, толщина опухоли) или на системном (отдаленные метастазы) уровне. Это связано с низкой онкологической настороженностью врачей общей сети и с поздним обращением за медицинской помощью к специалистам. Цель исследования – анализ выживаемости пациентов с тонкими меланомами (T₁).

Материалы и методы

Произведен анализ данных канцер-регистра и амбулаторных карт у пациентов с I стадией, находя-

щихся на диспансером учете в Приморском краевом онкологическом диспансере с 1997 по 2005 г. На учет в этот период в ПКOD с I стадией меланомы было взято 90 человек. Нам удалось собрать сведения о состоянии 43 пациентов в течение 3 лет. Учитывалась общая и безрецидивная 3-летняя выживаемость. Анализировались данные о правильности стадирования на основании гистологического заключения. Оценивалась правильность диагностики и соответствия гистологической и клинической стадии процесса.

Результаты

В гистологическом заключении уровень инвазии оценен у всех 43 пациентов. Из них с истинно положительным диагнозом (то есть 1–3 уровень инвазии по Кларку и/или толщина опухоли по Бреслоу менее 1,5 мм) было 37. Ложно-положительных из них (т.е. тех, у кого уровень инвазии 4 и более и/или толщина опухоли больше 1,5 мм, но врачом выставлена I стадия) – 6 человек. Ложно-отрицательных (т.е. тех, у кого уровень инвазии и/или толщина опухоли соответствует I стадии, но отнесены они к другой стадии, и отсутствуют метастазы в лимфатических узлах) – 58 человек, из них статистической обработке для определения 3-летней выживаемости подлежат 37 человек (таблица, рис. 1; 2.). Как видно из таблицы и рис. 1, 3-летний рубеж пережили 36 из 37 пациентов, что составило 97,3±2,7 % от взятых на учет с истинно положительным диагнозом I стадии меланомы кожи. Эти больные не получали никакого дополнительного лечения кроме хирургического в соответствии со стандартами.

Таблица

Общая и безрецидивная выживаемость у пациентов с I стадией меланомы кожи

№	Название	Абс число	Безрецидивная выживаемость		Общая выживаемость	
			абс	%	абс	%
1	Истинно положительные	37	30	81,1±6,4	36	97,3±2,7
2	Ложно положительные	6	2	33,3±19,3	3	50,0±20,4
3	Ложно отрицательные	37	27	73,0±7,3	33	89,2±5,1

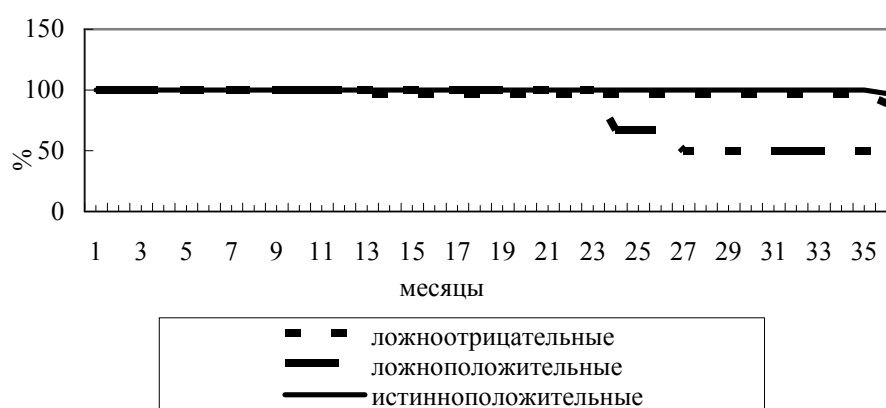


Рис. 1. Общая 3-летняя выживаемость больных с меланомой.

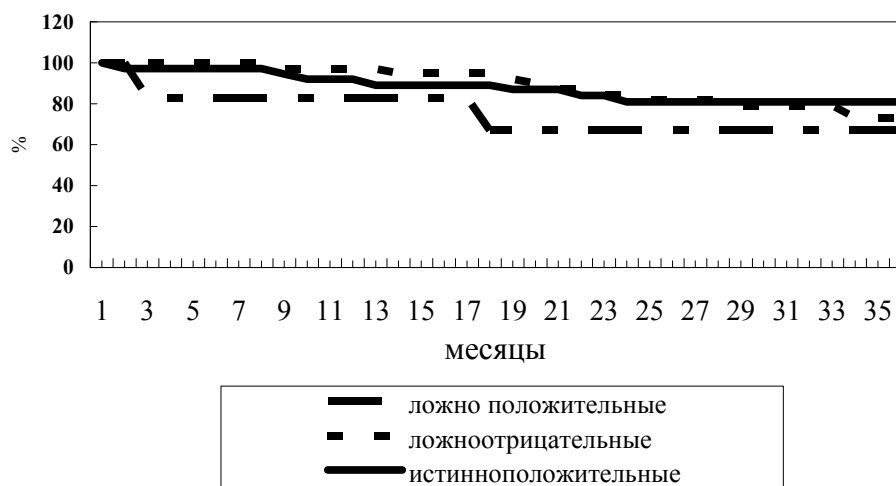


Рис. 2. 3-летняя безрецидивная выживаемость у больных с меланомой.

Литература

1. Демидов Л.В., Харкевич Г.Ю., Маркина И.Г. и др. Меланомы и другие злокачественные новообразования кожи. – Энциклопедия клинической онкологии. – С. 123–134
2. Юдин С.В., Ткачева Е.Ф. Некоторый анализ онкоэпидемиологической ситуации в Приморском крае и финансовых ресурсов краевого онкологического диспансера // Вопросы диагностики и лечения злокачественных опухолей. – Материалы 7 Дальневосточной онкологической конференции, 2005. – С. 5–14.
3. Stolz W. Color Atlas of dermatoscopy, 2002. – 542 p.
4. Rhodes A. Risk factors for cutaneous melanoma. A practical method of recognizing predisposed individuals JAMA, 1987. – P. 213–215.
5. Koh H.K., Geller A.C., Miller D.R. et al. Who is being screened for melanoma/skin cancer? Characteristics of persons screened in Massachusetts // J. Am. Acad. Dermatol. – 1991. – Febc 24 (2 Pt 1). – P. 271–7.

УДК 616-006-037:57.088

*Н.Е. Кушлинский, Е.С. Герштейн, Л.К. Овчинникова, М.А. Дигаева, И.К. Воротников, М.И. Давыдов***БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ОПУХОЛЕЙ В КЛИНИКЕ – ДОСТИЖЕНИЯ, ПРОБЛЕМЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ**

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация:

Кушлинский Николай Евгеньевич, заведующий лабораторией клинической биохимии РОНЦ.

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе 24; **тел.** +7(495)324-11-79**e-mail:** biochimia@mtu-net.ru

Статья поступила: 26.05.2009 г., принята к печати: 23.09.2009 г.

Резюме

Биологические маркеры опухолей в клинике – достижения, проблемы, перспективы.

В обзоре на примере основополагающих данных современной литературы и результатов собственных многолетних исследований рассматриваются основные биологически значимые тканевые маркеры опухолей человека: рецепторы стероидных гормонов, факторы роста и нижележащие сигнальные белки, ассоциированные с опухолью протеазы, маркеры ангиогенеза. Проанализированы методические аспекты, достижения предклинических исследований, международные рекомендации по клиническому использованию этих показателей в прогнозировании течения заболевания и назначении эффективной терапии. Представлены также последние данные о возможностях и ограничениях использования современных высокопроизводительных технологий (микрочипов) в качестве альтернативы исследованию индивидуальных биологических маркеров.

Ключевые слова: биологические маркеры опухолей, рецепторы стероидных гормонов, факторы роста, рецепторы факторов роста, протеинкиназы, опухоль-ассоциированные протеазы, маркеры ангиогенеза, микрочипы.

*N.E. Kushlinsky, E.S. Gershtein, L.K. Ovchinnikova, M.A. Digaeva, I.K. Vorotnikov, M.I. Davydov***THE TUMOR BIOLOGICAL MARKERS IN THE CLINIC – ACHIEVEMENTS, PROBLEMS, PROSPECTS**

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

Abstract

The main biologically significant human tumor tissue markers (steroid hormone receptors, growth factors and downstream signaling proteins, tumor-associated proteases, angiogenic markers) are reviewed based on the background contemporary publications and the results of long-term personal research. Methodic aspects, achievements of pre-clinical studies, and international recommendations on clinical implications of these parameters in disease prognosis and effective treatment choice are represented. The recent data on the possibilities and pitfalls of the usage of modern high throughput technologies (microarrays) as an alternative to the determination of individual biological markers are analyzed.

Key words: tumor biological markers, steroid hormone receptors, growth factors, growth factor receptors, protein kinases, tumor-associated proteases, angiogenic markers, microarrays.

Введение

Биологические (тканевые, клеточные или молекулярные) маркеры характеризуют индивидуальные особенности опухоли, специфику ее «биологического поведения» и регуляции.

Количество показателей, рассматривающихся в качестве потенциальных биомаркеров и проходящих более или менее масштабные предклинические исследования, увеличивается лавинообразно, отражая достижения и находки в области изучения механизмов проявления фундаментальных свойств опухолевых клеток, таких как метастазирование и инвазия, неограниченная пролиферация, способность противостоять апоптозу, а также их чувствительность к экзогенным и эндогенным регуляторам.

В табл. 1 представлен далеко не полный перечень показателей, являющихся действующими или потенциальными биологическими маркерами опухолей.

В их число входят:

- онкогены и протоонкогены;
- онкобелки;

- различные факторы роста, их рецепторы и нижележащие сигнальные белки (все они часто являются продуктами различных онкогенов);
- рецепторы стероидных и пептидных гормонов;
- супрессорные гены и продукты их экспрессии;
- гормонозависимые белки;
- протеазы, участвующие в процессах метастазирования, инвазии и ангиогенеза;
- белки, отвечающие за межклеточные контакты, и т.д.

Методологически в качестве биологического маркера может рассматриваться и изменение числа копий соответствующего гена или его мутация, и изменение уровня экспрессии гена (мРНК), и изменение количества синтезируемого белка или его функциональной активности, измеренной в строго контролируемых условиях. В связи с этим для определения биологических маркеров может быть использован весь арсенал методов современной молекулярной биологии, биохимии и иммунохимии.

Определение любого биологического маркера может иметь два практических результата:

- 1) выявление среди больных ранними стадиями, не подлежащих адъювантной терапии по другим клиническим и лабораторным показаниям, пациентов подгруппы с повышенным риском рецидивирования и/или метастазирования, требующих немедленного адъювантного лечения или более тщательного наблюдения;
- 2) оценка чувствительности опухоли к определенным видам терапии и индивидуализация схем адъювантного лечения больных с распространенным процессом.

В последнее время одним из важнейших практических результатов изучения молекулярно-биологических характеристик опухолей становится разработка новых препаратов, направленно воздействующих на эти молекулы и блокирующих регулируемые ими процессы.

Поскольку количество биологических маркеров, для которых в клинко-лабораторных исследованиях продемонстрирована потенциальная практическая значимость, очень велико, а стоимость и трудоемкость их определения весьма значительны, необходимы четкие критерии, позволяющие рекомендовать каждый конкретный показатель для практического применения [19]. Основные условия включения маркера в схему обследования больного и использования результатов его определения для выбора лечения:

- 1) определение маркера должно приводить к более благоприятным результатам лечения – увеличению безрецидивной или общей выживаемости, и/или улучшению качества жизни, и/или снижению стоимости лечения;
- 2) эти преимущества должны иметь I уровень доказательности – доказательства получены либо в специальном масштабном рандомизированном проспективном исследовании, либо в результате мета-анализа значительного числа относительно небольших исследований;
- 3) необходимы стандартизованные воспроизводимые методы с четко обозначенными критериями, а также наличие внутренних и внешних программ контроля качества.

Этим условиям удовлетворяют очень немногие маркеры, поэтому количество показателей, реально используемых и рекомендуемых международными организациями для обследования онкологических больных, ограничено.

В лаборатории клинической биохимии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН на протяжении многих лет проводится предклиническое исследование и при необходимости рутинное определение целого ряда маркеров, принадлежащих к различным биологически значимым подгруппам [6].

Рецепторы стероидных гормонов – критерий чувствительности к эндокринной терапии

Первым прочно вошедшим в клиническую практику биологическим маркером стали рецепторы стероидных гормонов – белки, специфически и избирательно связывающие соответствующие стероиды после их проникновения в клетку и опосредующие их биологические эффекты. Определение рецепторов стероидных гормонов используется для оценки гормональной чувствительности опухолей, в первую очередь, РМЖ, а также рака предстательной железы и рака эндометрия, что позволяет су-

щественно повысить эффективность эндокринной терапии у рецепторположительных больных и избавить пациентов с заведомо нечувствительными рецепторотрицательными опухолями от ненужных, травматичных (овариэктомия) или обладающих побочными эффектами (препараты) воздействий.

Помимо изучения традиционно гормонозависимых опухолей, перечисленных выше, нами был проведен радиолигандным методом скрининг рецепторного статуса различных злокачественных новообразований – сарком костей, меланомы, рака яичников, легкого, гортани, желудка, толстой кишки, почки, лейкозных клеток и лимфосарком – с целью выявления возможности включения в схемы их лечения эндокринной терапии [17]. Практически при опухолях всех локализаций был выявлен определенный процент новообразований, содержащих рецепторы того или иного класса стероидных гормонов (эстрогенов, прогестина, андрогенов или глюкокортикоидов), а в ряде случаев (остеогенная саркома, рак яичников, лимфолейкоз) было продемонстрировано прогностическое значение рецепторного статуса для безрецидивной и/или общей выживаемости больных. Тем не менее, мировой опыт свидетельствует о низкой эффективности гормонотерапии при вышеперечисленных новообразованиях, и только при раке молочной железы исследование рецепторов эстрогенов и прогестерона является обязательным по международным рекомендациям для всех первичных больных. Необходимость определения рецепторного статуса РМЖ для назначения эндокринной терапии была подтверждена мета-анализом, включавшим 37000 больных, участвовавших в 55 рандомизированных исследованиях.

Факторы роста, их рецепторы и нижележащие сигнальные белки – показатель способности опухоли к автономному росту

Чувствительность к эндокринным стимулам свойственна, как правило, опухолям с достаточно высокой степенью дифференцировки, сохраняющим определенную зависимость от регуляторных воздействий со стороны организма или от внешних стимулов. Между тем, одной из фундаментальных особенностей высокозлокачественных опухолей является способность к неограниченному автономному росту. В основе этого свойства лежат эффекты факторов роста – белков или полипептидов, продуцируемых опухолевыми клетками или другими компонентами опухолевой ткани (фибробластами, инфильтрирующими опухоль макрофагами и лимфоцитами, эндотелиоцитами) и взаимодействующих со специфическими рецепторами на поверхности клеток-продуцентов или соседних клеток, стимулируя в результате последующей сложной цепи событий клеточное деление.

Наиболее изученным и клинически реализованным является механизм действия сигнальной системы рецептора эпидермального фактора роста и родственных ему рецепторов семейства c-erbB или HER. В это семейство входят четыре белка – собственно РЭФР (ErbB-1, HER1), а также ErbB-2 (HER2/neu), ErbB-3 (HER3) и ErbB-4 (HER4) – сходные по структуре трансмембранные рецепторы, внутриклеточная часть которых обладает тирозинкиназной активностью. Известно довольно много лигандов рецепторов семейства c-erbB, наиболее известными из них являются эпидермальный и α -трансформирующий факторы роста, амфигулин и *cripto*, взаимодействующие только с РЭФР, а также херегулины (неурегулины), взаимодействующие с ErbB-3 и ErbB-4 [35]. Ни одного лиганда, взаимодействующего с рецептором ErbB-2 (HER2/neu), до настоящего времени не обнаружено.

Многими исследователями, в том числе, и в нашей лаборатории, было показано, что наличие в опухоли молочной железы классического РЭФР (HER1), в особенности, в отсутствии рецепторов стероидных гормонов, свидетельствует о неблагоприятном прогнозе заболевания даже на ранних стадиях и о резистентности к эндокринной терапии [7; 14]. Тем не менее, из-за неоднозначности результатов, полученных разными авторами, определение РЭФР не вошло в рутинную клиническую практику в качестве маркера общего прогноза или гормоночувствительности РМЖ.

Помимо рака молочной железы, РЭФР выявляются в опухолях самых разных локализаций. Так, в серии работ, проведенных в конце прошлого и начале этого века радиолигандным методом с использованием ^{125}I -меченного ЭФР с последующим разделением на гидроксилатапате, являвшимся тогда международно принятым «золотым стандартом» определения РЭФР в мембранной фракции тканей, мы показали, что эти рецепторы присутствуют в 32-75% злокачественных опухолей (табл. 2). Чаще всего, они обнаруживались при НМРЛ, для которого было продемонстрировано также значительное снижение безрецидивной и общей выживаемости больных при уровне РЭФР >20 фмоль/мг белка [12]. И хотя в тот период реального практического применения эти данные не нашли, они приобретают новое значение в последнее время, когда на стадию клинических испытаний и практического использования вышли препараты, специфически воздействующие на РЭФР, – МКА к рецептору (Эрбитукс) и ингибиторы его внутренней тирозинкиназы (Иресса®, Тарцева™), реализующей первый этап передачи митогенного сигнала [5; 28]. Эти препараты уже рекомендованы для лечения НМРЛ [31], а также опухолей головы и шеи, колоректального рака и рака поджелудочной железы [5]. В то же время исследования самых последних лет свидетельствуют о том, что чувствительными к анти-РЭФР направленным препаратам (в частности, к ингибиторам тирозинкиназы) являются не все рецепторположительные опухоли, а только те, в которых имеется делеционная мутация L858R в тирозинкиназном домене гена РЭФР (примерно 5% курящих и 40% некурящих РЭФР⁺-больных НМРЛ) [41]. В связи с этим на повестку дня встает вопрос о тестировании этой мутации у РЭФР-положительных больных НМРЛ в качестве необходимого дополнительного критерия чувствительности к данным молекулярно-направленным препаратам [45].

Огромный прорыв в области практического использования маркеров, связанных с РЭФР-зависимой регуляцией роста опухолей, произошел после появления препарата Герцептин, представляющего собой гуманизированные МКА к рецептору 2 типа (HER2/neu) – уникальному представителю семейства, который, не имея собственного лиганда и не взаимодействуя ни с одним из известных факторов роста, активирующих родственные рецепторы, является, тем не менее, ключевым звеном передачи митогенных сигналов всех ЭФР-подобных пептидов и необходим для успешного функционирования всей системы [18]. Ключевая роль HER2/neu объясняется тем, что основной особенностью всех трансмембранных рецепторных тирозинкиназ является необходимость димеризации для реализации киназной активности и последующих биологических эффектов, при этом после связывания активирующего лиганда рецепторы семейства ErbB могут образовывать как гомо-, так и гетеродимеры, а наиболее активными являются гетероструктуры с участием рецептора HER2/neu.

Блокирование HER2/neu может существенно замедлить или остановить рост опухолей, зависящих от подобных стимулов, однако эффективное использование биологически активных препаратов предусматривает предварительную оценку индивидуальной чувствительности больных к данному виду лечения [38]. Общепринятым методом оценки чувствительности к Герцептину является использование ИГХ-окрашивания опухолевых тканей на белок HER2/neu с последующей оценкой амплификации *c-erbB-2* методом флуоресцентной гибридизации *in situ* в спорных случаях, когда ИГХ метод не дает строго положительного или строго отрицательного ответа. Подобный подход хорошо зарекомендовал себя в лечении больных РМЖ, позволяя обеспечить максимальную эффективность Герцептина и избежать неоправданных затрат.

Что касается прогностического значения гиперэкспрессии или амплификации *c-erbB-2*, то, несмотря на гигантский материал (к настоящему времени в различных лабораториях мира обследовано уже несколько десятков тысяч больных РМЖ), единого мнения о прогностической ценности этого маркера до недавнего времени не было [19], однако с 2005 г. рекомендовано исследовать экспрессию (лучше – амплификацию) HER2/neu в числе других факторов для формирования групп риска среди больных ранними стадиями [27]. Есть также данные о том, что опухоли с амплифицированным геном HER2/neu слабо реагируют на эндокринную терапию, но чувствительны к последующей химиотерапии, при этом считается, что больным с HER2/neu-положительными опухолями следует рекомендовать более интенсивные режимы химиотерапии.

Наличие у HER-2/neu как внутри-, так и внеклеточной частей приводит к тому, что в процессе димеризации может происходить деградация молекулы рецептора и миграция его внешнего домена в межклеточную среду. Эта особенность легла в основу разработки иммуноферментных систем для определения растворимого HER2/neu в сыворотке/плазме крови. Уже опубликованы результаты, свидетельствующие о перспективности этого теста, в первую очередь, для мониторинга эффективности лечения Герцептином [33]. Тем не менее, признается необходимость дальнейшего набора материала и выработки четких количественных критериев для реального использования сывороточных показателей. В исследовании, проведенном на 59 первичных больных РМЖ I-III стадии, мы показали, что уровень растворимого HER2/neu в сыворотке крови больных с опухолями, характеризующимися высокой экспрессией этого белка (2+/3+ по данным ИГХ) достоверно выше, чем у больных с низкой экспрессией HER2, а после удаления первичной опухоли уровень HER2/neu в сыворотке крови большинства больных снижается [16]. Эти предварительные данные свидетельствуют о том, что показатели сыворотки крови в определенной степени отражают уровень экспрессии HER2/neu в первичной опухоли и их определение может стать достаточно адекватным независимым методом мониторинга статуса HER2/neu как в до-, так и в послеоперационном периоде. Многочисленные клинические испытания Герцептина в различных схемах лечения рака молочной железы показали его высокую эффективность у больных с высокой экспрессией белка и/или амплификацией *HER2/neu* в опухоли [18; 38], однако оказалось, что существуют и пациенты, исходно резистентные к этому препарату, несмотря на положительный HER2-статус опухоли, а также достаточно часто и быстро (в течение 1 года) резистентность к Герцептину развивается в процессе лечения [36].

Таблица 1

Основные группы биологически значимых показателей, которые используются или могут быть использованы в качестве биологических маркеров опухолей

Биологическое значение	Маркеры
Показатели гормональной чувствительности	Рецепторы стероидных гормонов: РЭ, РП, РА, РГ
Показатели активности ауто/паракринной регуляции пролиферации	Факторы роста и их рецепторы: рецепторы семейства c-erb (HER): РЭФР и его лиганды - ЭФР, α-ТФР, амфирегулин и др., HER2/neu; рецепторы инсулиноподобных факторов роста; рецепторы соматостатина
	Ферменты и белки, участвующие в передаче митогенных сигналов: рецепторные тирозинкиназы, МАП-киназы, PI3K, Akt, NFkB, STAT, Grb2 и др.
Показатели метастатической и инвазивной активности	Компоненты системы активации плазминогена: uPA, PAI-1, рецептор uPA, PAI-2, tPA
	Металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы
	Другие протеолитические ферменты
	Интегрины, кадгеринины
Показатели активности неоангиогенеза	VEGF A и его рецепторы 1 и 2 типа
	VEGF C и его рецептор
	Другие ангиогенные факторы: ФРФ, тимидинфосфорилаза, ФНО, интерлейкины и др.
	VEGF C и его рецептор
Регуляторы апоптоза	Другие ангиогенные факторы: ФРФ, тимидинфосфорилаза, ФНО, интерлейкины и др.
	Супрессорные гены и их продукты: p53, ген ретинобластомы
	Про- и антиапоптотические факторы: Fas-рецептор и Fas-лиганд, bcl-2, Akt, NFkB и др.
	Каспазы

Таблица 2

Частота выявления рецепторов эпидермального фактора роста в мембранной фракции злокачественных опухолей человека

Локализация опухоли	n больных	%РЭФР ⁺ опухолей	Ссылки
Рак молочной железы	291	38	[7, 14]
Первичные опухоли костей	115	58	[13]
Рак эндометрия	58	32	[1]
Рак легкого	63	75	[12]
Рак яичников	52	54	[4]
Рак пищевода	19	63	[4]
Всего	598	47	—

Все это стимулировало интерес к изучению механизма действия этого препарата и поиску возможных причин исходной и приобретенной резистентности [5]. Процесс передачи сигнала большинства факторов роста в упрощенном виде можно представить как последовательное фосфорилирование или дефосфорилирование ряда трансмембранных и внутриклеточных белков, многие из которых сами обладают ферментативной активностью. Распространение сигнала происходит путем последовательных воздействий одного белка в цепочке на другой. Важнейшие внутриклеточные системы, участвующие в реализации эффектов различных факторов роста – это сигнальный путь, включающий фосфатидилинозитол 3-киназу (PI3K) и ее нижележащий эффектор серин/треониновую протеинкиназу Akt, а также Ras-Raf сигнальный каскад, включающий систему митоген-активируемых протеинкиназ.

Достаточно репрезентативные и многоплановые исследования указывают на то, что конститутивная активация Akt (протеинкиназы B) и, в целом, PI3K/Akt-сигнального пути является одним из ключевых механизмов резистентности HER2⁺-клеток к Герцептину и другим препаратам, направленным против рецепторов семейства РЭФР, а также может рассматриваться в качестве одного из механизмов

гормонорезистентности рецепторположительных опухолей [5; 25]. В связи с этим мы провели два исследования, в одном из которых методом иммуноблоттинга была оценена экспрессия регуляторной p85 субъединицы PI3K [26], а в другом – иммуноферментным методом оценена экспрессия активированной (фосфорилированной по Ser473) Akt1 [24] в опухолях и прилежащих гистологически неизмененных тканях больных РМЖ. Оказалось, что активность этих двух компонентов одного сигнального каскада изменяется при малигнизации клеток молочной железы по-разному: в то время как экспрессия PI3K была увеличена в опухолях 79% больных и не зависела от основных клинико-морфологических факторов, включая статус рецепторов стероидных гормонов, Akt1 была активирована только в 49% опухолей, и частота ее активации положительно коррелировала с их размером и степенью злокачественности, была выше в РЭ⁺ РМЖ, чем в РЭ⁻, а соотношение со статусом РП было противоположным.

На основании этих результатов мы пришли к выводу о том, что, несмотря на кооперированную роль PI3K и Akt в регуляции роста и выживаемости клеток, их влияние на клиническое течение и гормональную или лекарственную чувствительность РМЖ может существенно различаться [25].

Ассоциированные с опухолью протеазы – показатель метастатического и инвазивного потенциала

Фундаментальным свойством злокачественных опухолей является способность к метастазированию и инвазии, важнейший механизм которых – разрушение окружающей базальной мембраны и внеклеточного матрикса ассоциированными с опухолью протеазами. Одно из ключевых мест в этих процессах занимает протеолитический каскад активации плазминогена в опухолевой ткани [20], а в многоступенчатой цепочке протеаз, ведущей к разрушению внеклеточного матрикса, ведущую роль играет активатор плазминогена урокиназного типа (uPA). Важную роль играет также находящийся на поверхности клеток рецептор uPA, поскольку при связывании с ним способность uPA активировать плазминоген увеличивается. В целом, процесс образования плазмينا представляет собой циклическую амплификацию, регулируемую по механизму обратной связи. Помимо uPA в нем участвует также активатор тканевого типа (tPA), роль которого в опухолях противоположна и сводится к разрушению опухолевых клеток и защите окружающих тканей. Активность uPA и tPA подавляется двумя белковыми ингибиторами, принадлежащими к семейству серпинов, – PAI-1 и PAI-2. Считается, что при опухолевом росте они также играют разную роль: PAI-1 защищает опухолевые клетки от саморазрушения, а PAI-2 тормозит протеолитические процессы во внеклеточном матриксе. Различные компоненты системы активации плазминогена могут находиться как на самих опухолевых клетках, так и на фибробластах стромы, инфильтрирующих опухоль лимфоцитах и макрофагах, эндотелиальных клетках, поэтому можно считать, что процесс активации плазминогена носит преимущественно паракринный характер. Уровень и соотношение экспрессии компонентов системы активации плазминогена в опухолевой ткани может служить показателем метастатической и инвазивной активности опухоли, являясь вследствие этого биологически значимым фактором прогноза [20].

В достаточно репрезентативных и многочисленных исследованиях продемонстрирована высокая прогностическая значимость при РМЖ uPA и PAI-1. Многофакторный анализ свидетельствует о том, что они являются независимыми факторами прогноза, причем уже имеется доказательная база I уровня: это проспективное рандомизированное кооперированное исследование, включавшее около 600 больных ранними стадиями РМЖ [30], и объединенный многофакторный анализ данных 18 исследовательских групп, включавший в целом информацию о 8377 больных [32]. Оба исследования показали, что высокие уровни uPA и PAI-1 являются независимыми факторами неблагоприятного прогноза, более значимыми, чем размер, степень злокачественности и рецепторный статус опухоли и возраст пациенток.

В связи с этим, их определение у больных ранними стадиями РМЖ уже могло бы быть рекомендовано для выявления подгрупп с повышенным риском рецидивирования и метастазирования, требующих более интенсивного лечения и наблюдения. Тем не менее, в настоящее время проводится кооперированное многоцентровое исследование «NNBC 3-Europe» [37]. В него планируется вовлечь около 6000 пациенток, и по его результатам будет сделан окончательный вывод о целесообразности включения uPA и/или PAI-1 в алгоритм обязатель-

ного обследования первичных больных РМЖ без метастазов в лимфатические узлы.

Являясь биологически значимыми факторами прогноза при различных новообразованиях, компоненты системы активации плазминогена могут стать мишенями молекулярно направленных антиметастатических препаратов, а для оценки перспективности их использования в клинике необходимо выявить нозологические формы опухолей и группы больных, у которых можно ожидать наибольшего эффекта. Основываясь на этом, мы провели масштабное исследование роли uPA, PAI-1 и tPA при опухолях различных локализаций, включавшее более 900 больных. Его основные результаты опубликованы в обзоре [8] и сводятся к тому, что значительное и координированное увеличение содержания uPA и PAI-1 является практически универсальным свойством различных злокачественных опухолей, а соотношение экспрессии компонентов системы активации плазминогена с клинико-морфологическими особенностями и прогнозом заболевания зависит от типа опухоли. В связи с этим было высказано предположение о том, что uPA является перспективной и достаточно избирательной мишенью для антиметастатической терапии при многих злокачественных опухолях.

В то время как разработка препаратов, направленных против uPA или других компонентов системы активации плазминогена, остается пока лишь перспективным направлением молекулярно направленной терапии, протеазы, активация которых является конечным звеном в разрушении внеклеточного матрикса, инициированном плазминовым каскадом, – а именно, металлопротеиназы, уже стали мишенями препаратов, проходящих различные фазы клинических испытаний (Маримастат, Неовастат, Col-3, BMS-275291 и др.). Эти агенты рассматриваются сейчас не только как антиметастатические, но и как антиангиогенные препараты.

В проводимом в настоящее время исследовании спектра экспрессии различных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов в опухолях больных раком толстой кишки, мы продемонстрировали, что эти новообразования характеризуются значительным и достоверным увеличением уровня MMP-2; 3; 7 и 13, а также TIMP-1 по сравнению с окружающими гистологически неизменными тканями [3; 23]. Следовательно, использование ингибиторов MMP при раке толстой кишки может оказаться весьма перспективным, тем более, что именно при этом заболевании достигнуты наибольшие успехи в области применения прямых антиангиогенными препаратами (Авастин).

Фактор роста эндотелия сосудов – показатель активности неоангиогенеза

Важную роль в регуляции опухолевой прогрессии играют факторы роста, стимулирующие развитие новых сосудов в опухоли – неоангиогенез [15; 22]. За последние 15 лет стало известно, что ключевым регулятором неоангиогенеза является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF/VEGF-A/VPF) [22] – белок, индуцирующий активный рост клеток эндотелия и формирование новых капилляров. Ряд фактов указывают на то, что VEGF не только обладает проангиогенной активностью, но может и непосредственно участвовать в регуляции пролиферации клеток опухоли. Об этом свидетельствуют, в частности, результаты работ, продемонстрировавших участие VEGF в регуляции выживаемости и пролиферации некоторых культивируемых *in vitro* опухолевых клеток [43].

Биологический эффект VEGF опосредуется его рецепторами VEGFR-1/Flt-1 и VEGFR-2/Flk-1/KDR, типичными рецепторными тирозинкиназами (трансмембранные гликопротеиды с молекулярной массой 170-235 kDa) [22].

Известно, что VEGF принимает участие в регуляции значительного числа внутриклеточных сигнальных путей как митогенных, так и антиапоптотических, в частности, нижележащими эффекторами VEGF являются белки, контролирующие апоптоз – Akt (протеинкиназа B) и Bcl-2 [22; 43].

В репрезентативных клинических исследованиях показано, что экспрессия VEGF при РМЖ имеет существенное значение для прогноза заболевания, а также влияет на чувствительность опухолей к гормональному и лекарственному лечению [15]. Его высокий уровень свидетельствует о неблагоприятном прогнозе – как при раннем, так и при распространенном РМЖ. В последние годы в литературе активно обсуждается также вопрос о роли сигнальных путей VEGF в клетках самого РМЖ.

По данным ряда авторов, уровень VEGF и его нижележащих эффекторов (VEGFR-1, VEGFR-2, PI3K, Akt, mTOR и др.) может иметь значение для прогноза выживаемости и чувствительности РМЖ к различным видам терапии. Кроме того, некоторые компоненты сигнального пути VEGF рассматриваются в настоящее время как перспективные мишени противоопухолевой терапии – особенно активно исследуются возможности подавления роста опухоли с помощью антител к VEGF (Авастин) и специфических ингибиторов тирозинкиназ VEGFR-1 и VEGFR-2 (например, Сутент).

Мы определили содержание VEGF, VEGFR-1 и VEGFR-2 в опухолях и гомологичных тканях 46 больных раком молочной железы [24]. Уровень VEGF и его рецепторов был достоверно повышен по сравнению с клетками окружающих гистологически неизмененных тканей молочной железы в 73-85% опухолей. Способность опухоли к повышенной продукции VEGF обнаружена уже на ранних стадиях заболевания.

Продемонстрирована также взаимосвязь компонентов VEGF-сигнального пути с показателями гормонозависимости: уровни VEGF и VEGFR-2 возрастали в опухолях с отрицательным статусом РП, при этом содержание VEGFR-2 достоверно коррелировало с уровнем РП. Кроме того, нам удалось показать, что тканевые концентрации VEGF и его рецепторов обоих типов в первичной опухоли достоверно положительно коррелируют между собой, что косвенно свидетельствовало об ауто/паракринной роли VEGF-сигнального пути при РМЖ. Это наблюдение было подтверждено и в последующем динамическом исследовании, проведенном у 30 больных местно-распространенным РМЖ, обследованных до и после проведения неoadъювантной химиолучевой терапии [11].

В этой работе мы показали также, что степень и направление изменений содержания VEGF и VEGFR2 в процессе предоперационной терапии зависели от исходных уровней данных белков, а их пост-лечебный уровень – от выраженности лечебного патоморфоза. Помимо РМЖ мы исследовали экспрессию VEGF в опухолях других локализаций – эндометрия, пищевода и желудка [2; 10].

Общими оказались положительная взаимосвязь тканевых уровней VEGF с показателями распространенности процесса, а также их прямая корреляция с содержанием uPA и PAI-1, что косвенно подтверждало участие этих компонентов системы активации плазминогена в неоангиогенезе.

Попытки использовать показатели содержания VEGF в сыворотке или плазме крови в качестве адекватной замены тканевой экспрессии этого белка при оценке активности ангиогенеза и прогнозирования исхода РМЖ и/или эффективности терапии до настоящего времени не принесли большого успеха.

Так, в наших исследованиях корреляция тканевых и сывороточных концентраций VEGF либо отсутствовала, либо была слабой, при этом после удаления первичной опухоли уровень VEGF в крови снижался лишь у половины больных [9].

Современные высокотехнологичные подходы к исследованию комплекса биологических маркеров

Использование технологии микрочипов позволяет одновременно исследовать амплификацию, экспрессию или транскрипцию многих тысяч генов и создавать т.н. «молекулярные портреты» или «генные подписи» опухолей.

Появление таких высокотехнологичных методик с огромной пропускной способностью и высокой чувствительностью, позволяющей работать с очень небольшим количеством материала, должно в ближайшие годы произвести революцию в области исследования биологических маркеров.

К их недостаткам следует отнести, в первую очередь, сложность стандартизации исследований и интерпретации результатов одновременного определения большого числа различных показателей.

«Пионером» в этой области, как и в изучении и клиническом использовании практически всех индивидуальных биологических маркеров, является РМЖ. Только за последние два года опубликовано более 70 статей, посвященных возможности использования «профилей экспрессии генов» или молекулярных портретов РМЖ в клинике.

К настоящему времени разработано несколько систем классификации этого заболевания на основе «генных подписей» – ограниченного набора генов, позволяющих выделять подгруппы больных с различным прогнозом и чувствительностью к определенным видам терапии [21; 29; 34; 39; 40; 42].

Оценка авторами клинической значимости собственных и чужих результатов колеблется от безоговорочного оптимизма, вплоть до предсказания «конца хирургической эры» в лечении РМЖ [42], до достаточно скептического анализа, подчеркивающего разнообразие и невоспроизводимость предложенных «подписей» и многочисленные методические трудности, возникающие при выполнении этих тонких методик и интерпретации их результатов [39].

В целом, ни одна из генных подписей не вошла пока в число международно признанных рекомендаций.

Лишь одна из наиболее известных систем [44], базирующаяся на анализе экспрессии 70 генов, проходит сейчас клинические испытания по международной программе Microarray for Node Negative Disease May Avoid ChemoTherapy (MINDACT) (EORTC 10041/ BIG 3-04: начало – сентябрь 2006 г.).

Заключение

Таким образом, благодаря успехам биохимии, молекулярной биологии и биотехнологии, в настоящее время в арсенале исследователей и клиницистов имеется огромное количество биологически значимых показателей, которые могут помочь в прогнозе и выборе адекватной лечебной тактики и схем терапии различных злокачественных новообразований.

Тем не менее, большинство молекулярных маркеров пока еще прочно не вошли в рутинную практику, что определяется высокой стоимостью подобных исследований, сложностью интерпретации данных одновременного анализа многих прогностических факторов и недостаточным уровнем доказательности для большинства тестов. Для рутинного клинического использования международными организациями рекомендовано в настоящее время лишь несколько биологических маркеров РМЖ, эффективность и полезность которых имеет достаточно высокий уровень доказательности, а именно:

- 1) определение РЭ и РП у всех первичных больных для решения вопроса о целесообразности назначения эндокринной терапии;
- 2) оценка экспрессии (амплификации гена) HER2/neu у больных распространенным раком, если планируется лечение Герцептином, или у больных ранним раком для включения в комплекс прогностических факторов;

- 3) находятся в стадии окончательной оценки возможность определения опухолевой концентрации PAI-1 и/или uPA, а также одной из «генных подписей» для выявления группы с повышенным риском рецидивирования и метастазирования среди больных ранними стадиями. При опухолях других локализаций определение биологических маркеров ограничено лишь отдельными протоколами по клиническому изучению различных молекулярно направленных препаратов.

Следует подчеркнуть, что с приходом новых высокопроизводительных технологий, позволяющих одновременно в очень небольшом образце определять несколько десятков или даже тысяч показателей, особенно актуальны выбор оптимального набора информативных тестов, который позволил бы при минимально возможной стоимости обследования обеспечить максимальную эффективность лечения каждого больного, и разработка адекватных алгоритмов интерпретации результатов этого комплексного анализа.

Литература

1. Герштейн Е.С., Бочарова Л.Б., Ермилова В.Д. и соавт. Рецепторы эпидермального фактора роста и их лиганды в карциномах эндометрия: связь с клинико-морфологическими факторами и рецепторами стероидов. Вопросы онкологии // Вопросы онкологии. – 2000. – Т. 46. – №2. – С. 180-6.
2. Герштейн Е.С., Грицаенко Е.В., Щербаков М.Е. и соавт. Фактор роста эндотелия сосудов и компоненты системы активации плазминогена при раке и гиперплазии эндометрия // Вопросы онкологии. – 2003. – Т. 49. – №6. – С. 725-9.
3. Герштейн Е.С., Короткова Е.А., Щербаков А.М. и соавт. Матриксные металлопротеиназы 7 и 9 и их тканевые ингибиторы 1 и 4 типа в опухолях и плазме крови больных раком толстой кишки // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2007. – Т. 143. – №4. – С. 438-41.
4. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Клинические перспективы исследования рецепторов эпидермального фактора роста в опухолях человека // Клиническая лабораторная диагностика. – 1996. – №1. – С. 9-12.
5. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Современные представления о механизмах передачи сигналов факторов роста как основа эффективной молекулярно-направленной противоопухолевой терапии // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2007. – №1. – С. 4-9.
6. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Тканевые маркеры как факторы прогноза при раке молочной железы // Практическая онкология: избранные лекции. Под ред. С.А.Тюляндина и В.М. Моисеенко. «Центр ТОММ», С.-Петербург. – 2004. – С. 41-50.
7. Герштейн Е.С., Муавия М.А., Кушлинский Н.Е., Летагин В.П. Прогностическое значение определения рецепторов эпидермального фактора роста у больных раком молочной железы I-II стадии: результаты шестилетнего наблюдения // Вопросы онкологии. – 1998. – Т. 44. – № 4. – С. 383-9.
8. Герштейн Е.С., Талаева Ш.Ж., Сандыбаев М.Н., Кушлинский Н.Е. Клиническая роль системы активации плазминогена в опухолях человека // Молекулярная медицина. – 2007. – № 1. – С. 4-8.
9. Герштейн Е.С., Щербаков А.М., Алиева С.К. и соавт. Фактор роста эндотелия сосудов в опухолях и сыворотке крови больных раком молочной железы // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2003. – Т. 135. – №1. – С. 99-102.
10. Герштейн Е.С., Щербаков А.М., Гончаров Д.Ю. и соавт. Фактор роста эндотелия сосудов при раке пищевода // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2004. – №1. – С. 26-9.
11. Ким Е.А., Герштейн Е.С., Субботина А.А. и соавт. Динамика экспрессии фактора роста эндотелия сосудов при различной неоадьювантной терапии рака молочной железы // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2007. – №3. – С. 38-42.
12. Костылева О.И., Дыхно А.Ю., Герштейн Е.С. и соавт. Клиническое и прогностическое значение экспрессии рецепторов эпидермального фактора роста при немелкоклеточном раке легкого // Бюлл. эксп. биол. мед. – 1999. – Т. 27. – №4. – С. 446-9.
13. Костылева О.И., Рабоченко А.А., Герштейн Е.С. и соавт. Клиническое значение рецепторов эпидермального фактора роста и их лигандов при остеогенной саркоме // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 1998. – №1. – С. 30-4.
14. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С. Рецепторы эпидермального фактора роста при раке молочной железы: от эксперимента к клинике // Бюлл. эксп. биол. мед. – 1998. – №11. – С. 485-96.
15. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С. Роль фактора роста эндотелия сосудов при раке молочной железы // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2002. – Т. 133. – №6. – С. 604-12.
16. Кушлинский Н.Е., Широкий В.П., Герштейн Е.С. и соавт. Растворимый фрагмент рецептора HER2/neu в сыворотке крови больных раком молочной железы с разным уровнем экспрессии этого белка в опухоли // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2007. – Т. 143. – №4. – С. 427-30.
17. Рецепторы стероидных гормонов в опухолях человека. Под редакцией Л.С. Бассалык // М., Медицина, 1987. – 223 с.

18. De Laurentis M., Cancellito G., Zinno L. et al. Targeting HER2 as a therapeutic strategy for breast cancer: a paradigmatic shift of drug development in oncology // *Ann. Oncol.* – 2005. – Vol. 16. – Suppl. 4. – iv7-iv13.
19. Duffy M.J. Predictive markers in breast and other cancers: a review // *Clinical Chemistry.* – 2005. – Vol. 51. – N3. – P. 494–503.
20. Duffy M.J., Duggan C. The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualized management of patients with cancer // *Clin. Biochem.* – 2004. – Vol. 37. – P. 541–8.
21. Fan C., Oh D.S., Wessels L. et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol. 355. – N6. – P. 560–9.
22. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors // *Nat. Med.* – 2003. – Vol. 9. – N6. – P. 669–76.
23. Gershtein E.S., Korotkova E.A., Scherbakov A.M. et al. Quantitative ELISA study of MMPs and TIMPs expression pattern in the tumors and plasma of colorectal cancer patients // *Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. Tumor Biology.* – 2007. – N28(Suppl.1) – P. 83.
24. Gershtein E.S., Scherbakov A.M., Anurova O.A. et al. Phosphorylated Akt1 in human breast cancer measured by direct sandwich enzyme-linked immunosorbent assay: Correlation with clinicopathological features and tumor VEGF-signaling system component levels // *Int. J. Biol. Markers.* – 2006. – Vol. 21. – P. 12–9.
25. Gershtein E.S., Scherbakov A.M., Shatskaya V.A. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signalling pathway components in human breast cancer: clinico-pathological correlations // *Anticancer Research.* – 2007. – Vol. 27. – N4A. – P. 1777–82.
26. Gershtein E.S., Shatskaya V.A., Kushlinsky N.E. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase expression in human breast cancer // *Clinica Chimica Acta.* – 1999. – Vol. 287. – P. 59–67.
27. Goldhirsch A., Glick J. H., Gelber R. D. & Panel Members Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005 // *Annals of Oncology.* – 2005. – Vol. 16. – P. 1569–83.
28. Harari P.M. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology // *Endocr. Relat. Cancer.* – 2004. – Vol. 11. – N4. – P. 689–708.
29. Ioannidis J.P. Gene expression profiling for individualized breast cancer chemotherapy: success or not? // *Nat. Clin. Pract. Oncol.* – 2006. – Vol. 3. – N10. – P. 538–9.
30. Janicke F, Prechtel A, Thomssen C, et al. For the German Chemo No Study Group. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 // *J. Natl. Cancer Instit.* – 2001. – Vol. 93. – P. 913–20.
31. Langer C.J. Emerging role of epidermal growth factor receptor inhibition in therapy for advanced malignancy: focus on NSCLC // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2004. – Vol. 58. – N3. – P. 991–1002.
32. Look M.P., van Putten W.L.J., Duffy M.J. et al. Pooled analysis of prognostic impact of tumor biological factors uPA and PAI-1 in 8377 breast cancer patients // *J. Natl. Cancer Instit.* – 2002. – Vol. 94. – P. 116–28.
33. Luftner D., Luke C., Possinger K. Serum HER-2/neu in the management of breast cancer patients // *Clin. Biochem.* – 2003. – Vol. 36. – N4. – P. 233–40.
34. Modlich O., Prissack H.B., Bojar H. Breast cancer expression profiling: the impact of microarray testing on clinical decision making // *Expert Opin. Pharmacother.* – 2006. – Vol. 7. – N15. – P. 2069–78.
35. Moghal N., Sternberg P.W. Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1999. – Vol. 11. – N2. – P. 190–6.
36. Nahta R., Esteva F.J. Herceptin: mechanisms of action and resistance // *Cancer Lett.* – 2006. – Vol. 232. – N2. – P. 123–38.
37. Persing M. M., Paepke D., Schmidt M. et al. on behalf of the NNBC-3 Study Group. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 for improved management in node-negative (N0) breast cancer: Experiences from the ongoing multicenter trial NNBC 3-Europe // *Journal of Clinical Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition).* – 2007. – Vol. 25. – N18S (June 20 Supplement). – P. 11081.
38. Plosker G.L., Keam S.J. Trastuzumab : a review of its use in the management of HER2-positive metastatic and early-stage breast cancer // *Drugs.* – 2006. – Vol. 66. – N4. – P. 449–75.
39. Puztai L., Mazouni C., Anderson K. et al. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential // *Oncologist.* – 2006. – Vol.11. – N8. – P. 868–77.
40. Reis-Filho J.S., Westbury C., Pierga J.Y. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer // *J. Clin. Pathol.* – 2006. – Vol. 59. – N3. – P. 225–31.
41. Rosell R., Taron M., Reguart N. et al. Epidermal growth factor receptor activation: how exon 19 and 21 mutations changed our understanding of the pathway // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12. – N24. – P. 7222–31.
42. Roukos D.H., Paraskevaidis E., Kappas A.M. Surgery in the era of gene expression profiling-based prediction and individualized, neoadjuvant breast cancer therapy: the beginning of the end? // *Ann. Surg. Oncol.* – 2006. – Vol. 13. – N3. – P. 433–5.
43. Ryden L., Stendahl M., Jonsson H. et al. Tumor-specific VEGF-A and VEGFR2 in postmenopausal breast cancer patients with long-term follow-up. Implication of a link between VEGF pathway and tamoxifen response // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2005. – Vol. 89. – N2. – P. 135–43.
44. Van de Vijver M.J., He Y.D., van't Veer L.J. et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer // *N. Engl. J. Med.* – 2002. – Vol. 347. – N25. – P. 1999–2009.
45. van Zandwijk N., Mathy A., Boerrigter L. et al. EGFR and KRAS mutations as criteria for treatment with tyrosine kinase inhibitors: retro- and prospective observations in non-small-cell lung cancer // *Ann Oncol.* – 2007. – Vol. 18. – N1. – P. 99–103.

УДК 618.19-006.6-091:615.277.3:575.117

*К.Р. Зейналова, Я.В. Вишневецкая, И.П. Ганьшина***ТРАСТУЗУМАБ В КОМБИНАЦИИ С ДОЦЕТАКСЕЛОМ И КАРБОПЛАТИНОМ В НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ТЕРАПИИ****МЕСТНОРАСПРОСТРАНЕННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ГИПЕРЭКСПРЕССИЕЙ HER-2 (КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация:

Зейналова Камала Руфат кызы, аспирант отделения химиотерапии и комбинированного лечения злокачественных опухолей НИИ КО РОНЦ.

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе 24; **тел.** +7(495)324-96-80**e-mail:** kamka80@yahoo.com

Статья поступила: 25.09.2009 г., принята к печати: 23.09.2009 г.

Резюме

В настоящем исследовании изучена непосредственная эффективность (частота достижения полной морфологической ремиссии в опухоли, мПР – отсутствие опухолевых клеток или единичные опухолевые клетки) неоадьювантной химиотерапии Доцетакселом (Д) + Карбоплатином (К) в комбинации с Трастузумабом (Герцептином, Т) у больных с IIIB-C стадией рака молочной железы с гиперэкспрессией HER-2.

Т в комбинации в химиотерапии при местно-распространенном раке молочной железы с гиперэкспрессией HER-2 повышает частоту достижения мПР.

Из 15 включенных в исследование больных раком молочной железы IIIB-C стадии, получивших 4-6 циклов химиотерапии Д 75 мг/м² + К АUC5 в комбинации с Т, у 8 (61,5%) достигнута мПР. Общая клиническая эффективность составила 85,7 % (3 полных эффекта и 9 частичных регрессий опухоли).

В проведенном исследовании показана высокая эффективность Трастузумаба в комбинации с Доцетакселом и Карбоплатином, а также определена ценность анализа морфологического ответа при оценке результатов неоадьювантной терапии у больных раком молочной железы с гиперэкспрессией HER-2.

Ключевые слова: HER-2, Трастузумаб, неоадьювантная терапия рака молочной железы.*K.R. Zeynalova, Ya.V. Vishnevskaya, I.P. Ganshina***TRASTUZUMAB WITH DOCETAXEL AND CARBOPLATIN IN NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY****HER2-POSITIVE LOCALLY ADVANCED BREAST CANCER****(CLINICOMORPHOLOGICAL ANALYSIS)**

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

Abstract

In this work analysed of the direct efficacy (pathological complete response rate, pCR – complete disappearance tumor in the breast and lymph nodes) of neo-adjuvant chemotherapy with the use of Docetaxel and Carboplatin in combination with Trastuzumab for treatment of patients (pts) with stage IIIB-C HER-2 overexpression breast cancer.

T in combination with chemotherapy increases pCR when used in neo-adjuvant setting in HER2-positive locally advanced breast cancer pts.

From fifteen enrolled pts (median age 58 years; range 35 to 76) stage IIIB-C breast cancer received Docetaxel 75 mg/m² Carboplatin AUC5 and Trastuzumab 8 mg/kg then 6 mg/kg for 4-6 cycles 8 pts (61,5%) achieved pCR. Objective clinical response achieved in 85,7 % of pts (3 – CR and 9 – PR, respectively).

In the conducted research high efficiency of Trastuzumab in combination with Docetaxel and Carboplatin was shown and also the pathological response analysis value was defined in neo-adjuvant chemotherapy results assessment in HER-2 overexpression breast cancer pts.

Key words: HER-2, Trastuzumab, breast cancer, neo-adjuvant treatment.**Введение**

Важным компонентом комплексного лечения местнораспространенного рака молочной железы с гиперэкспрессией HER-2 является неоадьювантная химиотерапия в сочетании с Трастузумабом. Следует отметить, что при местнораспространенном раке молочной железы гиперэкспрессия HER-2 обнаружена чаще, чем при ранних стадиях (35-40% и 15-20%, соответственно). Гиперэкспрессия HER-2 сочетается с агрессивным течением болезни и ухудшением прогноза [1]. Использование химиотерапии в сочетании с Трастузумабом значительно улучшает ре-

зультаты лечения. При этом важным критерием оценки эффекта является достижение полной или почти полной морфологической регрессии опухоли (отсутствие клеток опухоли или единичные опухолевые клетки). Недавно завершено рандомизированное исследование при HER-2-положительном местнораспространенном РМЖ [2]. 235 больных получили неоадьювантную ХТ (Трастузумабом – 117, без Трастузумаба – 118). При сроке наблюдения 3,2 года Трастузумаб значительно увеличил безрецидивную выживаемость. Кроме того, увеличилась частота полной морфологической ремиссии (43%-ХТ в комбинации с Трастузумабом, 22% – без Трастузумаба).

Задачей нашего исследования является изучение частоты полной или почти полной морфологической регрессии опухоли после неоадьювантной химиотерапии Доцетакселом и Карбоплатином в сочетании с Трастузумабом при местнораспространенном раке молочной железы. Кроме того, изучены побочные эффекты при проведении лечения.

Характеристика и методы исследования

Данные о больных и проявлениях болезни представлены в табл. 1. Лечение проведено у 15 больных с местнораспространенным РМЖ (T₃₋₄N₁₋₃). Во всех случаях диагноз до начала лечения подтвержден при гистологическом исследовании.

Таблица 1

Характеристика больных	Критерий	Количество больных (%)
Медиана возраста		58
диапазон		35 – 76
Менструальный статус		
пременопауза		6 (40 %)
постменопауза		9 (60 %)
Стадия		
IIIb		8 (53,3 %)
IIIc		7 (46,7 %)
T		
T ₂		1 (6,7 %)
T _{4b}		11 (73,3 %)
T _{4d}		3 (20 %)
N стадия		
N ₁		6 (40 %)
N ₂		2 (13,3 %)
N ₃		7 (46,7 %)
Морфологическая форма		
инфильтративный протоковый		11 (73,4 %)
инфильтративный дольковый		2 (13,3 %)
инфильтративный смешанный		2 (13,3 %)
Степень злокачественности		
II		12 (80 %)
III		3 (20 %)
Мультицентричный рост		4 (26,7 %)
Размер узла в молочной железе		
< 2 см		2 (13,3 %)
2–5 см		7 (46,7 %)
> 5 см		3 (20 %)
отечно-инфильтративная форма		3 (20 %)
Рецепторный статус		
положительный		6 (40 %)
отрицательный		9 (60 %)
HER-2 статус		
2+/FISH+		4 (26,7 %)
3+		11 (73,3 %)

Гиперэкспрессия HER-2 в опухоли доказана во всех случаях (HERceptest, DAKO или FISH). ХТ включала 4–6 циклов лечения Доцетакселом 75 мг/м² и Карбоплатином AUC 5 с интервалом в 3 нед. Одновременно больные получили Трастузумаб в дозе 8 мг/кг, затем 6 мг/кг в/в каждые 3 недели.

После завершения неоадьювантной терапии больные были оперированы (модифицированная радикальная мастэктомия) с последующей лучевой и адьювантной терапией в соответствии со стандартными критериями.

Для оценки клинического эффекта неоадьювантной терапии использовали маммографию для описания опухолевых изменений в молочной железе и УЗТ для анализа размера лимфоузлов. Выделяли полную ремиссию, частичную ремиссию и отсутствие эффекта (RECIST критерии). Обследование проводилось до начала лечения, после 2–3 курсов и перед операцией.

Морфологический ответ анализировали в соответствии с классификацией В. Chevallier et al [3] (1993), которая включает отсутствие инвазивной опухоли (класс I–II) или сохранение очагов инва-

зивной опухоли в молочной железе или лимфоузлах (класс III–IV). Полная морфологическая ремиссия устанавливается при классе I–II.

Результаты

Из 15 больных, получивших неоадьювантную терапию в режиме Трастузумаб + Доцетаксел + Карбоплатин, 14 пациенток прооперировано в объеме радикальной мастэктомии. 1 больная в связи с недостаточным эффектом после 5 курсов химиотерапии дополнительно получила лучевую терапию, в связи с этим из анализа морфологического эффекта исключена. Одна больная продолжает лечение и также исключена из анализа морфологического эффекта. Полная или частичная ремиссия по клиническим данным получена у 12/14 больных (85,7%). Из них 3 (21,4%) пациентки имели полную ремиссию, 9 (64,3%) – частичную.

При морфологическом исследовании оказалось, что клинические и морфологические данные часто не совпадают. Сведения о полной морфологической ремиссии (класс I–II) представлены в табл. 2.

Таблица 2

Морфологический эффект, оцененный у 13/14 прооперированных больных

Характеристика по В. Chevallier	Количество больных (%)
пПР в молочной железе и в лимфатических узлах	8 (61,5%)
пПР + рак <i>in situ</i> в молочной железе и пПР в лимфатических узлах	1 (7,6%)

Таким образом, полный морфологический ответ установлен у 9/13 больных (69,1%). Проведено сопоставление клинического и морфологического ответа. При частичной клинической ремиссии у 5 из 9 больных доказан полный морфологический ответ (I–II класса).

Приведенные результаты позволяют сделать вывод, что морфологическое изучение опухоли после неоадьювантной терапии более четко характеризует результаты лечения. Приводим клиническое наблюдение, показывающее что остаточные очаги могут быть проявлением фиброза.

Больная П., 76 лет, диагноз: местнораспространенный рак левой молочной железы T_{4b}N₃M₀, IIIС.

Стадия: мультифокальный рост.

Гистология: инфильтративный дольковый рак III степени злокачественности.

ИГХ: РЭ – отрицательные, РП – положительные, HER-2 «+++».

До начала лечения в левой молочной железе выявлено два опухолевых узла размерами 3,5 см и 1,4 см с изъязвлением соска, в левой подмышечной области конгломерат лимфатических узлов 4,3 см, множественные подключичные лимфатические узлы от 0,4 см до 1,4 см (цитологически верифицированы).

Неоадьювантно больная получила 6 курсов химиотерапии Трастузумаб + Доцетаксел + Карбоплатин. После завершения лечения установлен частичный эффект противоопухолевого лечения (большой опухолевый узел в молочной железе уменьшился до 2,5 см, второй узел перестал определяться, из регионарных л/узлов остался 1 подмышечный лимфатический узел слева до 1,8 см). Далее выполнена операция в объеме радикальной мастэктомии. При гистологическом исследовании остаточный узел в молочной железе размером 3,5×3 см., при микроскопии – выраженный фибросклероз, липогранулемы, очаговая лимфоидноклеточная инфильтрация, отложения липофусцина, очаговый отек стромы – достоверных признаков опухолевого роста в молочной железе не обнаружено. В 8 из 18 изученных лимфатических узлах – метастазы рака молочной железы с признаками лечебного патоморфоза I класса.

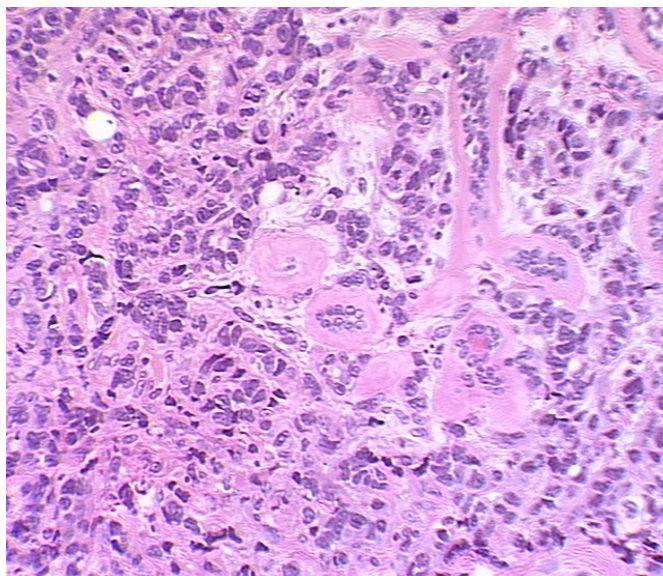


Рис. 1. Дольковый инфильтративный рак III ст. злокачественности (×20).

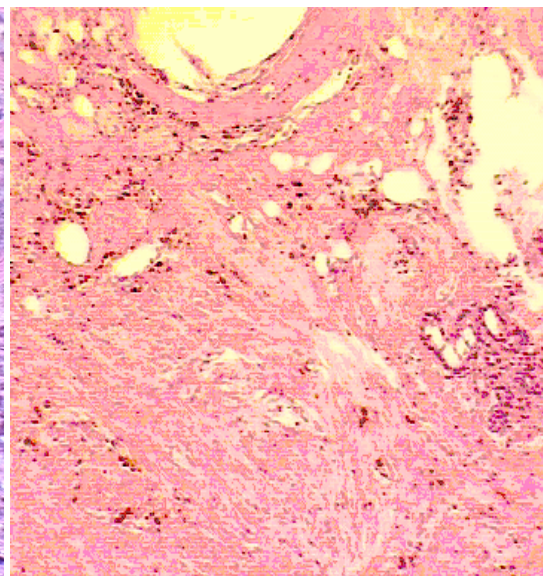


Рис. 2. Липогранулема, фиброз, скопление гемосидерофагов – I класс лечебного патоморфоза.

Побочные эффекты

Нейтропения III–IV степени длительностью 4–6 дней отмечена в 76% циклов (фебрильная нейтропения – 14,7%). Тромбоцитопения I степени имела место в 40% циклов; повышение печеночных трансаминаз I–II степени – в 29,3%; стоматит, диарея II степени – в 10,7%; боли в суставах и мышцах II–III степени – в 14,6%, астения II–III степени – в 38,6%. Побочные эффекты представлены в табл. 3. Использованный режим ХТ с Трастузумабом показал отсутствие кардиотоксичности. В 1 случае бессимптомное снижение фракции выброса левого желудочка на 10% не препятствовало завершению неоадьювантной терапии. Синдром задержки жидкости развился у 4 больных. Интервалы между курсами были сохранены во всех случаях.

Заключение

В проведенном исследовании показана высокая эффективность Трастузумаба в комбинации с Доцетакселом и Карбоплатином а также определена ценность анализа морфологического ответа при оценке результатов неоадьювантной терапии у больных раком молочной железы с гиперэкспрессией HER-2.

Прежде было показано, что Трастузумаб способен увеличить эффективность химиотерапии. В исследовании Buzdar et al. [4] комбинация Трастузумаба с Паклитакселом привела к полной морфологической регрессии у 66,7% больных (только Паклитаксел – 25%).

Таблица 3

Побочные эффекты всех степеней, отмеченные у 15 больных в 75 циклах химиотерапии

Побочный эффект	I степени n %	II степени n %	III степени n %	IV степени n %
анемия	26 (34,7)	0	0	0
нейтропения	8 (10,4)	15 (20)	34 (45,3)	23 (30,7)
тромбоцитопения	30 (40)	0	0	0
кровоточивость слизистых	15 (20)	0	0	0
стоматит	20 (26,7)	6 (8)	0	0
тошнота	10 (13,3)	2 (2,7)	0	0
диарея	13 (17,3)	2 (2,7)	0	0
гепатотоксичность	22 (29,3)	2 (2,7)	1 (1,3)	1 (1,3)
сыпь	5 (6,7)	2 (2,7)	0	0
отеки	15 (20)	4 (5,3)	0	0
мышечно-суставной синдром	11 (14,7)	10 (13,3)	1 (1,3)	0
нейропатия	21 (28)	3 (4)	0	0
ЛПС	2 (2,7)	1 (1,3)	0	0
астения I ст	31 (41,3)	25 (33,3)	4 (5,3)	0
алопеция	0	15 (20)	0	0
фебрильная нейтропения*	11 (14,7)			
*все случаи объединены				

В исследовании [5] Coudert et al., у 30 больных раком молочной железы T₂₋₃ (79% T₂, 42% N₁₋₂) при комбинации Трастузумаба и Доцетаксела полная морфологическая ремиссия составила 47%, клинический ответ – 96%. Режим лечения включал Доцетаксел 100 мг/м² каждые 3 нед. и Герцептин 4–2 мг/кг еженедельно.

Лечение сопровождалось нейтропенией 3–4 степени у 85% больных (фебрильная нейтропения – 18% больных или 4% курсов). Радикальная резекция выполнена у 77% больных. В нашем исследовании использована доза Доцетаксела 75 мг/м² + Карбоплатин AUC5 и Трастузумаб каждые 3 недели. Следует отметить, что в отличие от вышеописанного исследования лечение проведено при более значительных проявлениях местнораспространенного рака молочной железы с гиперэкспрессией HER-2 (IIIB–IIIC стадии). Частота клинического

ответа составила 85,7 %, полная морфологическая ремиссия достигнута у 69,1% больных.

Исследование показало роль методологии при оценке результатов лечения. Тщательно проведенное морфологическое исследование является наиболее информативным. Достижение полной морфологической ремиссии, как известно, в общей группе больных раком молочной железы предсказывает более значительный период безрецидивной выживаемости и прогнозирует увеличение общей выживаемости [6]. В группе больных с гиперэкспрессией HER-2 исследования не завершены.

Среди других перспективных подходов обсуждается анализ генной экспрессии при HER-2 положительном раке молочной железы у больных, получающих неоадьювантную химиотерапию в сочетании с Трастузумабом для предсказания полной морфологической регрессии опухоли.

Литература

1. J.S. Ross, E.A. Slodkowska, W. Fraser symmans, et al. The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2 Therapy and Personalized Medicine. The Oncologist 2009;14:320–368.
2. L. Gianni, W. Eiermann, V. Semiglazov, G.M. Manikhas, A. Lluch, S. Tjulandin et al.: Neoadjuvant trastuzumab in patients with HER-2 positive locally advanced breast cancer: A randomized phase III trial with a parallel HER-2 negative cohort (the NOAH trial). 2008
3. Chevallier B. et al. Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction therapy results in a high histologic response rate. Am J Clin Oncol 1993, v 16, p 223–8.
4. Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. J Clin Oncol 2005; 23: 3676–3685.
5. Coudert BP, Arnould L, Moreau L, et al. Pre-operative systemic (neo-adjuvant) therapy with trastuzumab and docetaxel for HER2-overexpressing stage II or III breast cancer: results of a multicenter phase II trial. Ann Oncol 2006;17:409–414.
6. Priya Rastogi, Stewart J. Anderson, Harry D. Bear, et al. Preoperative Chemotherapy: Updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. Journal of Clinical Oncology, Vol 26, No 5 (February 10), 2008: pp. 778–785.

УДК 575.117.2:616-006.04

*А.М. Дейчман, С.В. Зиновьев, А.Ю. Барышников***ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ И МАЛЫЕ РНК В ОНКОЛОГИИ**

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация:

Дейчман Александр Маркусович, с.н.с. группы биофизики неионизирующих излучений РОНЦ.

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе 24; **тел.** +7(499)611-82-10**e-mail:** biotherapy_rbj@mail.ru

Статья поступила: 25.09.2009 г., принята к печати: 23.09.2009 г.

Резюме

В статье представлена роль малых РНК, контролирующих большинство жизненно важных функций клетки и организма, и возможная связь их, в частности, с онкогенезом и другими (включая гипотетические) внутриклеточными механизмами геномной экспрессии.

Ключевые слова: малые РНК, интерференция РНК (РНКи), двунитевая РНК (днРНК), редактирование РНК, онкогенез.

*A.M. Deichman, S.V. Zinoviev, A.Yu. Baryshnikov.***THE GENE EXPRESSION AND SMALL RNAS IN ONCOLOGY**

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

Abstract

In the paper role of small RNAs supervising the majority vital functions of cell and organism and possible connection of them in particular with oncogenesis and others (including hypothetical) intracellular mechanisms of genome expression is submitted.

Key words: Small RNAs, interference RNAs (RNAi), double strand RNAs (dsRNAs), RNA editing, tumorigenesis.

Введение

Экспрессия отдельных генов и целых геномов эукариот, включая процессинг, различные виды транскрипции, сплайсингов, перестановок, редактирования РНК, рекомбинаций, трансляцию, интерференцию РНК, регулируется некоторыми белками (продуктами регуляторных, структурных, гомеостатических генов, транскрипционными факторами), подвижными элементами, РНК и низкомолекулярными эффекторами. Среди процессирующих РНК – рРНК, тРНК, мРНК, некоторые виды регуляторных РНК и малые РНК.

К настоящему времени известно, что малые РНК не кодируют белок, часто исчисляются сотнями на геном и участвуют в регуляции экспрессии различных эукариотических генов (соматических, иммунных, герминативных, стволовых клеток).

Под контролем оказываются процессы дифференцировки (гематопоз, ангиогенез, адипогенез, миогенез, нейрогенез), морфогенеза (включая эмбриональные стадии, развитие и рост, физиологическую регуляцию), пролиферации, апоптоза, канцерогенеза, мутагенеза, иммуногенеза, старения (продления жизни), эпигенетического сайленсинга [3; 8; 21; 23; 38; 36; 46; 52; 83]; отмечены случаи метаболической регуляции (например, гликолипосфинголипидов [32]).

Более широкий класс некодирующих РНК в 20–300/500 нуклеотидов и их РНП обнаружены не только в ядре, ядрышке и цитоплазме [10], но и в ДНК-содержащих клеточных органеллах (митохондриях животных [*ibid.*]; у растений найдены микроРНК [16] и консенсусные к транскриптам хлоропластов последовательности малых РНК [75]).

Для управления и регуляции в.н. процессами важно:

1. Небольшие по размерам естественные и искусственные РНК (малые РНК, тРНК, подобн.) и их комплексы с белками (РНП) способны к чрезмембранному клеточному и митохондриальному транспорту [6; 10; 71];
2. После распада митохондрий часть их содержимого, РНК и РНП, могут оказаться в цитоплазме и ядре. Перечисленные свойства малых РНК (РНП), функционально значимая роль которых в процессе изучения только увеличивается, очевидно, имеют связь с фактором настороженности в отношении рака и других генетических заболеваний [72].

Одновременно проявилась высокая значимость эпигеномных модификаций хроматина при возникновении опухолей [95]. Мы рассмотрим только очень ограниченное число случаев из множества подобных.

Малые РНК

Механизм действия малых РНК состоит в способности их почти комплементарно связываться с 3'-нетранслируемыми областями (3'-НТО) мРНК-мишеней (которые иногда содержат ДНК- и РНК-транспозирующие *MIR/LINE-2*-элементы, а также консервативные *Alu*-повторы) и вызывать интерференцию РНК (РНКи); в частности, при антивирусном ответе [89]. Осложнение, однако, в том, что кроме клеточных существуют и вирус-кодируемые малые РНК (герпеса, SV40, др.; EBV, например, содержит 23, а KSHV – 12 miRNAs [8]), взаимодействующие с транскриптами и вируса и хозяина.

Одних только клеточных и вирусных miRNAs известно более 5 тысяч у 58 видов [8]. РНКи инициирует либо деградацию (с участием комплекса RISC, RNA-Induced Silencing Complex) по уязвимым для нуклеаз фрагментам непрерывных спиралей днРНК (двунитевых РНК мРНК, др.), либо частично обратимое ингибирование прерывисто спирализованных днРНК при трансляции мРНК-мишеней. Зрелые малые РНК (~15-28 нуклеотидов) образуются в цитоплазме из своих, процессирующих в ядре, предшественников различной длины (в десятки и сотни нуклеотидов) [33]. Кроме того, малые РНК участвуют в формировании сайленсиновой структуры хроматина, регуляции транскрипции отдельных генов, подавлении экспрессии транспозонов и поддержании функциональной структуры протяженных участков гетерохроматина [7].

Различают несколько основных видов малых РНК. Наиболее хорошо изучены микро-РНК (miRNAs) и малые интерферирующие РНК (siRNAs). Кроме того, среди малых РНК изучаются: активные в герминативных клетках piRNAs [82; 84]; малые интерферирующие РНК, ассоциированные с эндогенными ретротранспозонами и повторяющимися элементами (при локальной и глобальной гетерохроматинизации – начиная с ранних стадий эмбриогенеза; поддерживают уровень теломер), gasiRNAs дрозофилы [96]; часто кодируемые интронами белковых генов и функционально важные при трансляции, транскрипции, сплайсинге (метилировании и деметилировании, псевдоуридилровании нуклеиновых кислот) малые ядерные (snRNAs) и ядрышковые (snoRNAs) РНК [103]; комплементарные ДНК-связывающим NRSE-(Neuron Restrictive Silencer Element)-мотивам малые модуляторные РНК, smRNAs, с малоизвестными функциями [56]; трансактивирующие малые интерферирующие РНК растений, tasiRNAs [33]; короткие шпилечные РНК, shRNAs, обеспечивающие долговременную РНКи (устойчивый генный сайленсинг) длинных днРНК-структур при антивирусном ответе у животных [77].

Малые РНК (miRNAs, siRNAs, др.) взаимодействуют с новосинтезируемыми транскриптами ядра и цитоплазмы (регулируя сплайсинг, трансляцию мРНК; метилирование и псевдоуридилрование рРНК, др.) и хроматина (при временно-локальной и эпигенетически наследуемой гетерохроматинизации делящихся соматических герминативных клеток) [8]. Гетерохроматинизация, в частности, сопровождается метилированием и деметилированием ДНК, а также метилированием, ацетилированием, фосфорилированием и убиквитинированием гистонов (модификация «гистоновой коды») [1].

Первыми среди малых РНК были обнаружены и исследованы miRNAs нематоды *Caenorhabditis elegans* (lin-4), их свойства и гены [63; 100], а несколько позже – miRNAs растения *Arabidopsis thaliana* [16]. В настоящее время их связывают с многоклеточными организмами [88], хотя они показаны у одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* [111], а РНКи-подобные пути сайленсинга, в связи с противовирусной защитой с участием т.н. psiRNAs, обсуждаются для прокариот [45]. Геномы многих эукариот (в том числе дрозофилы, человека) содержат несколько сотен генов miRNAs. Эти стадио- и тканеспецифичные гены (как и соответствующие им участки мРНК-мишеней) часто высокогомологичны у филогенетически отдаленных видов, но некоторые из них – линиоспецифичны [39]. miRNAs содержатся в экзонах (белок-кодирующих, РНК-генов), интронах (чаще всего пре-мРНК), межгенных спейсерах (включая повторы), имеют длину до 70-120 нуклеотидов (и

более) и формируют шпилечные структуры типа петля-стебель [51]. Для определения их генов используют не только биохимические и генетические, но и компьютерные подходы [88].

Наиболее характерная длина «рабочего участка» зрелых miRNAs – 21-22 нуклеотида. Возможно, это самые многочисленные среди не кодирующих белки генов. Они могут располагаться в виде отдельных копий (чаще) или кластеров, содержащих множество сходных или различных генов miRNAs, транскрибирующихся (нередко с автономных промоторов) в виде более длинного предшественника, процессируемого в несколько стадий до индивидуальных miRNAs [106]. Предполагают, что существует регуляторная miRNA-сеть, контролирующая множество фундаментальных биологических процессов (включая онкогенез и метастазирование); вероятно, не менее 30% экспрессируемых генов человека регулируются miRNAs [64].

В этом процессе участвуют днРНК-специфические РНКазы-III-подобные ферменты Drosha (ядерная рибонуклеаза; инициирует процессинг интронных пре-miRNAs после сплайсинга основного транскрипта) и Dicer, функционирующий в цитоплазме и расщепляющий и деградирующий, соответственно, шпилечные пре-miRNAs (до зрелых miRNAs) и образуемые позже гибридные miRNAs-мРНК структуры. Малые РНК, вместе с несколькими белками (включая в.н. РНКазы, белки AGO-семейства, трансметилазы и ацетилазы, др.) и с участием т.н. RISC- и RITS-подобных комплексов (второй – индуцирует транскрипционный сайленсинг), способны, соответственно, вызывать РНКи и деградацию и последующий генный сайленсинг на РНК- (до и во время трансляции) и ДНК- (при транскрипции гетерохроматина) уровнях.

Каждая miRNA потенциально спаривается со множеством мишеней, а каждая мишень – контролируется рядом miRNAs [88] (что напоминает gRNAs-опосредуемое редактирование пре-мРНК в кинетопластах трипаносом). Анализ *in vitro* показал, что miRNAs-регуляция (как и редактирование РНК) – ключевой посттранскрипционный модулятор экспрессии генов. Сходные miRNAs, конкурирующие за одну мишень – потенциальные трансрегуляторы РНК-РНК и РНК-белковых взаимодействий.

У животных miRNAs наиболее хорошо изучены для нематоды *Caenorhabditis elegans*; описано более 112 генов. Здесь обнаружены и тысячи эндогенных siRNAs (генов нет; связаны, в частности, со сперматогенез-опосредуемыми транскриптами и транспозонами [80]). Обе малых РНК многоклеточных могут генерироваться РНК-полимеразами, проявляющими активность (не гомологию) RdRP-II (как для большинства других РНК) и RdRP-III типов [62]. Зрелые малые РНК схожи по составу (включая концевые 5'-фосфаты и 3'-ОН), длине (обычно 21-22 нуклеотида) и функции, и могут конкурировать за одну мишень [107]. Однако РНК-деградацию, и при полной комплементарности мишени, чаще ассоциируют с siRNAs; трансляционную репрессию, при частичной, обычно в 5-6 нуклеотидов, комплементарности – с miRNAs; а предшественники, соответственно, экзо- и эндогенные (в сотни и тысячи нуклеотидов) для siRNAs, и обычно эндогенные (в десятки и сотни нуклеотидов) для miRNAs [29; 107] и биогенез у них различны [33]; moreover, в некоторых системах эти различия обратимы. РНКи, опосредуемая siRNAs- и miRNAs, имеет разнообразные естественные роли: от регуляции экспрессии генов и гетерохроматина – до защиты генома против транспозонов и вирусов; но siRNAs и часть miRNAs не консервативны между видами.

У растений (*Arabidopsis thaliana*) обнаружены: siRNAs, соответствующие как генам, так и межгенным (включая спейсеры, повторы) областям; огромное число потенциальных сайтов генома для различных типов малых РНК [68]. У нематод открыты также т.н. изменчивые автономно экспрессируемые 21У-РНК (dasRNAs); они имеют 5'-У-монофосфат, составляют 21 нуклеотид (20 из них изменчивы), и располагаются между или внутри интронов белок-кодирующих генов по более чем 5700 сайтам двух областей IV хромосомы [80].

MiRNAs играют важную роль при экспрессии генов в норме и патологии; у человека – не менее 450-500 таких генов [8]. Связываясь обычно с 3'-НТО-областями мРНК (др. мишенями), они могут избирательно и количественно (в частности, при выведении из оборота продуктов низкоэкспрессируемых генов [88]), блокировать работу одних и активность других генов. Оказалось, что наборы профилей экспрессируемых микро-РНК (и их мишеней) динамически меняются в процессе онтогенеза, дифференцировки клеток и тканей. Эти изменения специфичны, в частности, при кардиогенезе [88], процессе оптимизации размеров длины дендритов и числа синапсов нервной клетки (с участием miRNA-134, др. малых РНК) [73], развитии многих патологий (онкогенезе, иммунодефицитах [28], генетических заболеваниях [34], паркинсонизме [98], болезни Альцгеймера [48], офтальмологических нарушениях (ретинобластома [27], др.), связанных с инфекциями различной природы [87]). Общее число обнаруживаемых miRNAs растет много быстрее, чем описание их регуляторной роли и связи с конкретными мишенями.

Компьютерный анализ предсказывает сотни мРНК-мишеней для отдельных miRNAs [88] и регуляцию индивидуальных мРНК множеством miRNAs. Таким образом, miRNAs могут служить целям элиминации транскриптов генов-мишеней, либо тонкой настройки их экспрессии на транскрипционном и трансляционном уровнях. Теоретическое рассмотрение и экспериментальные результаты подтверждают существование разнообразных ролей miRNAs.

Более полный перечень аспектов, связанных с фундаментальной ролью малых РНК у эукариот в процессах роста и развития и при некоторых патологиях (включая эпигеномику рака), отражены в обзоре [8].

Малые РНК в Онкологии

Процессы роста, развития, прогрессии и метастазирования опухолей сопровождаются множеством эпигенетических изменений, перерастающих в более редкие стойко-наследимые генетические изменения [8]. Редкие мутации, однако, могут иметь большой вес (для конкретных индивидов, нозологии), т.к. в отношении отдельных генов (например, *APC*, *K-ras*, *p53*) возможен т.н. эффект «воронки», связанный с почти необратимыми развитием и последствиями онкозаболеваний. Опухольеспецифическая [58] в отношении профиля экспрессии различных генов (белков, РНК, малых РНК) гетерогенность клеток-предшественников обуславливается сопряженными вариациями перестраиваемых эпигеномных структур. Эпигеном модулируется метилированием, посттрансляционными модификациями и заменами гистонов (на неканонические), ремоделингом нуклеосомной структуры генов и хроматина (включая геномный импринтинг, т.е. дисфункцию экспрессии аллелей родительских генов и X-хромосом). Все это, и с участием РНК, регулируемой малыми РНК, ведет к появлению де-

фектных гетерохроматиновых (включая гипометилированные центромерные [40]) структур [8].

Формированию ген-специфических мутаций может предшествовать известное накопление сотен тысяч соматических клональных мутаций в простых повторах или микросателлитах некодирующей (редко – кодирующей) области – по крайней мере в опухлях с микросателлитным мутаторным фенотипом (ММФ) [52; 79]; они составляют значительную часть раков толстой и прямой кишки, а также раков легких, желудка, эндометрия, др. Нестабильные моно- и гетеронуклеотидные микросателлитные повторы (поли- A_{6-10} , подобн.) содержится во много раз чаще в контролирующих экспрессию генов регуляторных некодирующих (интроны, межгенно), чем в кодирующих (экзоны) областях генома микросателлит-нестабильных, MSI⁺, опухолей.

Хотя природа появления и механизмы локализации MS-стабильных и нестабильных областей до конца неясны, формирование MS-нестабильности коррелировало с частотой мутаций множества ранее не мутирующих в MSI⁺-опухолях генов [52; 79] и, вероятно, канализировало пути их прогрессии; причем частота мутаций MSI-повторов в этих опухолях увеличивалась более чем на два порядка [52; 79]. Не все гены проанализированы на наличие повторов, но степень мутабельности их в кодирующих и некодирующих областях различна, а точность методов определения частоты мутаций – относительна [52; 79]. Важно, что некодирующие области по MSI-мутабельным повторам часто биаллельны, а кодирующие – моноаллельны [79].

Глобальное снижение метилирования в опухолях характерно для повторов [49], мобильных элементов (МЭ; их транскрипция увеличивается), промоторов, CpG-сайтов опухолесупрессорных miRNA-генов и коррелирует с гипертранскрипцией ретротранспозонов в клетках прогрессирующих раков [86]. В норме колебания «метилома» связаны с родительско-и стадийспецифическими, а также тканеспецифическими «волнами метилирования» и сильным метилированием центромерных сателлитных участков гетерохроматина, регулируемых малыми РНК.

При недометилировании сателлитов формируемая нестабильность хромосом сопровождается усилением рекомбинации [54], а нарушение метилирования МЭ может запускать их экспрессию [23]. Эти факторы благоприятствуют развитию опухолевого фенотипа. Терапия малыми РНК может быть высокоспецифичной, но должна быть контролируемой, т.к. мишенями могут оказаться не только отдельные, но и множество мРНК/РНК молекул, и новосинтезируемые РНК различных (включая некодирующие межгенные повторы) областей хромосом [8].

Большую часть генома человека составляют повторы и МЭ. Ретротранспозон L1 (LINE-элемент) содержит, как и эндогенные ретровирусы, ревертазу (RTase), эндонуклеазу и потенциально способен переносить неавтономные (*Alu*, *SVA*, др.) ретрозомы [17]; сайленсинг L1-подобных элементов осуществляется в результате метилирования по CpG-сайтам [57].

Заметим, что среди CpG-сайтов генома слабо метилированы CpG-островки промоторов генов, а сам 5-метилцитозин – потенциально мутагенное основание, дезаминируемое в тимин [57] (химически, или при участии редактирования РНК/(ДНК), репарации ДНК); однако некоторые из CpG-островков подвержены избыточному aberrантному метилированию, сопровождаемому репрессией генов-супрессоров и развитию рака [38; 57].

Далее: РНК-связывающий белок, кодируемый L1, взаимодействуя с белками AGO2 (семейства Argonaute) и FMRP (fragile mental retardation, белок эффекторного RISC-комплекса [43]), способствует перемещению L1-элемента – что указывает на возможную взаиморегуляцию систем РНК и ретропозиции LINE-элементов человека. Важно, в частности, что *Alu*-повторы способны перемещаться в область интрон-экзонного пространства генов [8; 30].

Эти и подобные механизмы могут усиливать патологическую пластичность генома опухолевой клетки. Подавление RTase (кодируемой, как и эндонуклеаза, элементами L1; RTase также кодируется и эндогенными ретровирусами) по механизму РНК сопровождается снижением пролиферации и усилением дифференцировки в ряде раковых клеточных линий [92]. При внедрении L1 элемента в протоонкоген или супрессорный ген наблюдали двунитевые разрывы ДНК [99].

В тканях зародышевого пути (мышей, человека) уровень экспрессии L1 повышен, а его метилирование зависело от piRNAs-(26-30-п.о.)-связанной системы сайленсинга, где PIWI-белки – варианты большого семейства белков Argonaute, мутации в которых ведут к деметилированию и дерепрессии L1-подобных элементов с длинными концевыми повторами. С PIWI-белками же в большей степени, чем с Dicer-1/2 и Ago-белками, связаны пути сайленсинга rasiRNAs [96].

Опосредуемые piRNAs и siRNAs пути сайленсинга реализуются через внутриядерные тельца, содержащие крупные эволюционно-консервативные мультибелковые PcG-комплексы, функции которых в опухолевых клетках часто нарушаются. Эти комплексы отвечают за даль-нодействие (через более чем 10 тысяч пар оснований, в том числе между хромосомами) [85] и регулируют кластер генов *HOX*, ответственных за план строения тела [8; 81].

Новые принципы антисенс-терапии могут развиваться с учетом знаний о более высокоспецифичных (чем гистонмодифицирующие ингибиторы метилирования ДНК/белков) противоопухолевых эпигеномных агентах, фундаментальных основ эпигеномного РНК-сайленсинга и роли малых РНК в канцерогенезе [8].

Микро-РНК в Онкологии

Известно, что усиление опухолевого роста и метастазирования могут сопровождаться повышением одних и понижением экспрессии других индивидуальных/наборов miRNAs (табл.). Некоторые из них могут иметь причинную роль в онкогенезе; и даже одни и те же miRNAs (как miR-21/-24) в разных опухолевых клетках могут проявлять как онкогенные, так и супрессирующие свойства. Каждый тип злокачественных опухолей человека хорошо различим своим «miRNA-отпечатком», и некоторые miRNAs могут функционировать как онкогены, опухолевые супрессоры, инициаторы клеточной миграции, инвазии, метастазирования [8]. В патологически измененных тканях часто обнаруживают пониженное количество ключевых miRNAs, вероятно включенных в системы противораковой защиты. Участвующие в онкогенезе miRNAs (miRs) сформировали представление о т.н. «онкомирах» [8; 37]: анализ экспрессии более 200 miRNAs свыше 1000 образцов лимфом и солидных раков позволил успешно классифицировать опухоли на подтипы по их происхождению и стадии дифференцировки [14]. Функции и роль miRNAs успешно изучают с помощью: анти-miR-олигонуклеотидов, модифицированных (для увеличения времени жизни) по 2'-О-метильным [24] и 2'-О-метоксиэтильным группам [36]; а также LNA-олигонуклеотидов, в которых кислородные атомы рибозы в положениях 2' и 4' соединены метиленовым мостиком [24].

Таблица

miRNAs, экспрессия которых увеличивается (↑) или уменьшается (↓) в некоторых наиболее распространенных опухолях по сравнению с нормальными тканями (см. [55], а также [8]).

Опухоль	miRNAs
Рак легких	17-92↑, let-7↓, 124a↓, 126↓, 143↓, 145↓, 155↑, 191↑, 205↑, 210↑
Рак молочной железы	21↑, 125b↓, 145↓, 155↑
Рак простаты	15a↓, 16-1↓, 21↑, 143↓, 145↓
Рак опухоли кишечника	19a↑, 21↑, 143↓, 145↓
Рак поджелудочной железы	21↑, 103↑, 107↑, 155v↑
Рак яичников	210↑
ХЛЛ	15a↓, 16-1↓, 16-2↑, 23b↑, 24-1↑, 29↓, 146↑, 155↑, 195↑, 221↑, 223↓

Считается, что регулирующая роль экспрессии, исчезновения и амплификации miRNA-генов в предрасположенности к инициации, росту и прогрессии большинства опухолей значительна, а мутации в парах miRNA и мРНК-мишень синхронизированы [18]. Профиль экспрессии miRNAs может использоваться для классификации, диагностики и клинического прогноза в онкологии. Изменения в экспрессии miRNAs могут затрагивать клеточный цикл, программу выживаемости клетки [18]. Мутации miRNAs в стволовых и соматических клетках (как и выбор полиморфных вариантов мРНК-мишеней) могут способствовать, или даже играть критическую роль при росте, прогрессии и патофизиологии многих (если не всех) злокачественных новообразований [18]. С помощью miRNAs возможна коррекция апоптоза [19].

Кроме индивидуальных miRNAs обнаружены их кластеры, выступающие в роли онкогена, провоцирующего развитие, в частности, рака кроветворной

ткани у подопытных мышей; гены miRNAs с онкогенными и супрессорными свойствами могут располагаться в одном кластере. Кластерный анализ профилей экспрессии miRNAs в опухолях позволяет определить ее происхождение (эпител, кроветворная ткань, др.) и классифицировать разные опухоли одной ткани с неидентичными механизмами трансформации [8]. Оценку профиля экспрессии miRNAs можно осуществлять с использованием нано- и микрочипов; точность такой классификации, при отработке технологии (что не просто), оказывается выше, чем с использованием профилей мРНК [69]. Некоторые из miRNAs участвуют в дифференцировке кроветворных клеток (мышь, человек), инициации прогрессии раковых клеток [21]. Человеческие miRNA-гены часто располагаются в т.н. «ломких» сайтах, областях с преобладанием делеций и вставок, точечных разрывов, транслокаций, транспозиций, минимально делезируемых и амплифицируемых областей гетерохроматина, вовлеченных в онкогенез [91].

Ангиогенез

Роль miRNAs в ангиогенезе, вероятно, значительна. Усиление ангиогенеза в некоторых *Мус*-активированных аденокарциномах человека сопровождалось изменением характера экспрессии одних miRNAs, а нокдаун генов других miRNAs вел к ослаблению и подавлению роста опухоли [31]. Рост опухоли сопровождался мутациями в *K-ras*, *Мус* и *TP53* генах, усилением продукции ангиогенного VEGF-фактора и степени *Мус*-ассоциированной васкуляризации; при этом антиангиогенные факторы *Tsp1* и CTGF подавляли miR-17-92 и др. кластер-ассоциированными miRNAs. Ангиогенез и васкуляризация опухоли усиливались (в частности, в колониях) при коэкспрессии двух онкогенов в большей степени, чем одним [31].

Нейтрализация антиангиогенного LATS2 фактора, ингибитора циклинзависимой киназы животных (CDK2; человек и мышь), с помощью miRNAs-372/373 («потенциальные онкогены») стимулировала рост опухоли семенников без повреждения p53 [97].

Потенциальными модуляторами ангиогенных свойств (*in-vitro/in-vivo*) являются miR-221/222, мишени которых, рецепторы *c-Kit* (др.), – факторы ангиогенеза эндотелиальных венозных HUVEC клеток пуповины, др. Эти miRNAs и *c-Kit* взаимодействуют в рамках сложного цикла, контролирующего способность эндотелиальных клеток к формированию новых капилляров [78].

Хронический лимфолейкоз

При В-клеточном ХЛЛ отмечают пониженный уровень экспрессии генов miR-15a и miR-16-1 (и др.) в 13q14 участке хромосомы человека [20] – сайте наиболее общих структурных аномалий (включая делеции участка в 30kb), хотя геном экспрессировал сотни зрелых и пре-miRNAs человека [22]. Обе потенциально эффективные при терапии опухолей miRNAs содержали антисенс-участки антиапоптотического белка Bcl2, подавляли его экспрессию и сверхэкспрессию, стимулировали апоптоз, но почти полностью отсутствовали в двух третях «отбившихся» от нормы ХЛЛ-клеток. Идентифицированы частые мутации секвенированных miRNAs в стволовых и соматических клетках у 11 из 75 пациентов (14,7%) с семейной предрасположенностью к ХЛЛ (способ наследования неизвестен), но не у 160 здоровых пациентов. Эти наблюдения вызывают предположение о прямом функционировании miRNAs в лейкозогенезе [88]. В настоящее время не все известно о связи уровней экспрессии генов miRNAs (и их функций) и других генов в нормальных и опухолевых клетках [22].

Кроме того, определены мутации в вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина, IgV(H), стволовых неделящихся и сверхэкспрессирующих белок Bcl2 CD5⁺-клеток; это может быть важно в отношении не только ХЛЛ, но и спектра связанных малигнизаций [19]. Профили экспрессии в.н. miRNAs в нормальных и ХЛЛ-малигнизированных В-клетках уникальны и могут иметь прогностическое значение при сопоставлении с обычно коррелирующими уровнями IgV(H)-мутаций, экспрессии пре-лейкемического белка Zap-70 и ХЛЛ-прогрессии. Значительные различия в.н. уровней экспрессии идентифицированы разными методами (Northern blot, real-time-PCR, компьютерный расчет) [22].

Лейкозы смешанного происхождения

При ОМЛ-1 транскрипционные факторы связываются с сайтами инициации транскрипции огром-

ного количества генов и с 30% всех обнаруженных miRNA-сайтов. Это говорит о потенциально широкой возможности дисрегуляции экспрессии и мРНК и miRNAs, лежащей в основе лейкозных фенотипов [88]. Ввиду того, что miRNAs могут управлять молекулярными аспектами клеточной специализации, гемопоэз представляется эффективной моделью системной проверки механизмов действия и функций miRNAs. Эта область разрабатывает различные аспекты возобновления гемопоэза и молекулярно-клеточной специализации с участием miRNAs; ожидают-ся открытия, связанные с регуляторными функциями большей части генома, не кодирующей ни белки, ни известные вспомогательные РНК [88].

Острый лимфобластный лейкоз

В случае пре-В-клеточного ОЛЛ (пре-В-ОЛЛ) у пациентки 35 лет, с диагнозом: злокачественная опухоль яичника, состояние после ВДХ с аллоТКМ, вторичный лейкоз) наблюдали вставку в 42 нуклеотида (неизвестного происхождения) внутри реаранжированного генного локуса IgH-цепи иммуноглобулина (из 11q24-области хромосомы). Вставка оказалась частью miRNA-125b-1 гена-гомолога lin-4 (нематоды *C.elegans*). Процесс шел на ранних (стволовоклеточных) стадиях лейкозогенеза и вел к нарушению экспрессии собственных малых РНК, изменениям в IgH-гене-мишени и aberrантной дифференцировке [91].

Лейкозы

В клеточных линиях лейкоза человека идентифицировано несколько линиоспецифических кластеров miRNAs, обогащенных некоторыми общими (mir-29c, mir-302, mir-98, mir-29a, let-7a-1) и индивидуальными miRNAs (mir-181c, mir-181d, mir-191, mir-136) [106]. Глобальный анализ 326 консенсус-выравненных miRNA-генов человека обнаружил, что 148 из них располагаются в 51 кластере (приблизительно по 3 miRNAs в каждом). Это также напоминает ситуацию с редактированием РНК в кинетопластах трипаносом (простейшее), где на одно миникольцо приходится в среднем 3 gRNAs; но gRNAs контролируют экспрессию генов у одноклеточного, а miRNAs – у многоклеточных (хотя возможно участие их и других малых РНК для одноклеточных, водоросли и прокариот, – также обсуждаются [45; 111]). *MiRNA*-гены одного кластера могут экспрессироваться и вместе, и порознь. В 39 кластерах (из 51) экспрессия miRNAs была последовательной. Это обнаружение подтверждает жизненно важную роль кластеризованных и индивидуальных miRNAs в гемопоэзе и онкогенезе, и обеспечивает ключевое понимание функций и механизма действия их в различных биопроцессах. В различных кластерах обнаружено значительное число паралогичных miRNAs, что говорит о возможной синхронной эволюции их и комплементарных участков мРНК- и РНК-мишеней у разных видов [106].

Ходжкинские и другие лимфомы

В клетках большинства HL (а также В-лимфом средостения, и диффузных больших В-клеточных лимфомах) наблюдают высокую экспрессию и первичного транскрипта, pri-miR-155 (шпилечная РНК с miR-155 внутри), и зрелой miR-155 [78], необходимой для функционирования В- и Т-клеток [26; 83; 94]. Экспрессия miR-155 показана также в первичных пролиферирующих пре-В-клетках селезенки и КМ. Роль miR155 состоит в индукции поликлональной экспансии лимфоцитов, располагающей к вторичным генетическим изменениям при последующей трансформации их [78].

Экспрессия miR-155 возрастает также при лимфоме Беркита [59; 74], В-клеточном ОЛЛ [35; 41; 60], при раке легкого [104], РМЖ и раке поджелудочной железы [42]; среди мишеней miR-155 имеются цитокины, хемокины и транскрипционные факторы [35; 41; 42; 59; 60; 74; 83; 104].

Гепатоцеллюлярный рак

В клетках ГЦР, но не в нормальных или временно подверженных голоданию (по фолиевой кислоте, метионину, холину) клетках печени крыс-самцов линии Фишер, обнаружено опухоль-специфическое снижение экспрессии только miR-122, но не *let-7a*, miR-21, miR-23, miR-130, miR-190, miR-17-92 [61]. Экстраполяция этого изучения на человека также показала, что экспрессия miR-122 была достоверно снижена ($P=0,013$; в 10 из 20 случаях), а сама miR-122 может оказаться приемлемым биомаркером процесса ракового перерождения печени [*ibid.*].

Колоректальный рак

Методом real-time-PCR идентифицировано 13 зрелых miRNAs (из 156 исследованных), которые дифференциально экспрессировались в неопухолевых клетках прямой кишки. В то же время в KPP-клетках экспрессия этих 13 miRNAs (особенно miR-31, miR-96, miR-133b, miR-135b, miR-145, miR-183) была значительно снижена [13]. Сделано 2 вывода: существуют стадиоспецифические (в частности, в отношении miR-31) и потенциально альтернативные уровни регуляции KPP-клеток с участием miRNAs; профиль экспрессии miRNAs имеет прогностическое значение в отношении биологического и клинического поведения данного типа опухоли [*ibid.*].

Рак молочной железы

Показано, что miR-17-5p может увеличивать опухолесупрессорную активность, связанную с ингибированием трансляции онкогена AIB1 (amplified in breast cancer-1). Эта активность, однако, падала при снижении экспрессии самой miR-17-5p; одновременно понижалась экспрессия генов эстрогензависимых и независимых рецепторов [50].

Усиление метастатического потенциала в легких и костном мозге при первичном РМЖ сопровождалось потерей экспрессии специфических наборов miRNAs (в частности, miR-126 и miR-335). Наоборот, поддержание экспрессии miR-126 в малигнизированных клетках приводило к уменьшению опухолевого роста и пролиферации, а в случае miR-335 – к ингибированию метастатической инвазии. miR-335 регулирует экспрессию генов, связанных с риском отдаленных метастазов (транскрипционного фактора SOX4, компонента внеклеточного матрикса tenascin C, др.) [90].

Кроме того, при этом раке (у человека, мыши) инвазия и метастазирование инициировались сверхэкспрессией специфической miR-10b, индуцируемой плейотропным транскрипционным фактором Twist (вероятно, связывающимся с промоторми miR-10b, MIRN10B). Одновременно miR-10b ингибировала трансляцию мРНК-продукта гомеобокса D10 и чрезмерную экспрессию прометастатического гена *RHOC*. Уровень экспрессии miR-10b в клетках рака молочной железы хорошо коррелирует с клинически выявляемой прогрессией [66].

Рак легкого человека

При этой опухоли слабо или вовсе не экспрессировалась miRNA *let-7*. Наоборот, ингибирование роста опухоли вызывалось сверхэкспрессией

let-7 (гомологом *C.elegans*) – потенциальным опухолевым супрессором, подавляющим образование онкобелков Ras и HMGA2 [8]. В имитирующих курение условиях и при ответе на стресс, при апоптозе, пролиферации, ангиогенезе, экспрессии генов, кроме *let-7*, контролирующей в норме экспрессию ассоциированных с раком легкого протоонкогенов, также к ранним событиям относят понижение (в разной степени) экспрессии ряда других miRNA-семейств: miR-10, miR-26, miR-30, miR-34, miR-99, miR-122, miR-123, miR-124, miR-125, miR-140, miR-145, miR-146, miR-191, miR-192, miR-219, miR-222, и miR-223. При раке легких расположенные в т.н. «ломких» сайтах miRNA-гены часто делетировали. Одновременно экспрессия miR-294 (ингибитор транскрипции репрессорных генов) и некоторых не-miRNA-генов повышалась [53].

Малые интерферирующие РНК в онкологии

Другой тип исследований связан с малыми интерферирующими РНК – т.н. siRNAs. В отличие от miRNAs и piRNAs, они собственно генов не имеют, происходят из длинных днРНК эндо- и экзогенной природы (у человека, нематод, дрозофилы, растений), часто синтезируются искусственно и используют цис- и трансдействующие механизмы сплайсинга генов-мишеней [32]. В многочисленных опытах вводимые в разных векторах siRNAs модифицируют множество сигнальных путей при нормальных и патологических процессах (включая канцерогенез).

В настоящее время считается, что механизмы действия и перспективы использования miRNAs и siRNAs в значительной степени схожи: взаимодействие малых РНК и их мишеней (при РНКи) сопровождается деградацией или обратной и необратимой блокировкой трансляции хозяйских и вирусных мРНК. Результатом такой РНКи, по крайней мере, может быть ослабление прогрессии онкологического заболевания. Преимущества использования РНКи состоят в высокой специфичности и эффективности, а также в низкой токсичности индуцированных ею процессов. Индукция сайленсинга малыми РНК перспективна в отношении отдельных генов и более крупных локусов хромосом [*ibid.*].

Одна из стратегий терапии рака связана, в частности, с трансфекцией ретровирусных siRNA-содержащих плазмид, уменьшающих уровень экспрессии мРНК тимидилат-синтазы на 80-95% (в *HeLa*, др.); мишенями были определенные (898-916 и 965-983) нуклеотидные позиции фермента [105].

Гепатоцеллюлярный рак

При этом виде рака, а также в случае острого и хронического гепатитов эффективными были опосредованные лентивирусом siRNA-1 и siRNA-7 (механизмы разные; эффективность большая, чем при действии ламивудина). Эти siRNAs подавляли экспрессию HBV-вирусных и десятки-сотни (от 54 до 499) клеточных генов линии HepG2.2.15 *in vitro* (по 18 генов регулировались обеими siRNAs) [44]. Также важно, что лентивирусный вектор, содержащий pol-III-промотор с искусственными siRNA-генами (генными кассетами), способен обеспечить трансдукцию неделящихся клеток, длительное поддержание экспрессии трансгенов, нокаут генов-мишеней, эффективную генную (в частности, антивирусную) терапию в различных тканях (мозг, печень, мышцы) и кроветворных клетках. Анализ результатов позволил заключить, что siRNA-терапия, вместе с традиционной антивирусной терапией, могут вести к эффекту потенцирования [65].

Возможна также антисенстерapia, основанная на внутриопухолевом введении латентно действующих микросфер с anti-VEGF-siRNAs, переходя к длительному генотерапевтическому эффекту и направленная на подавление экспрессии генов различных факторов (в частности, ангиогенных), активирующих канцерогенез у млекопитающих [76].

Рак молочной железы

Торможение роста опухоли, как и снижение экспрессии мРНК рецептора эпидермального фактора роста, усиливались при трансфекции клеток векторами с EGFR-специфичными, но не другими siRNAs. При введении этих siRNAs внутри липофектамин-2000-содержащих липосом *in vivo*, длительность генного сайленсинга и эффективность РНКи возрастали по сравнению с таковыми в случае предварительной трансфекции этих клеток *in vitro* [101].

Аналогично, трансфекция клеток MCF-7 рака молочной железы человека *in vitro* и *in vivo* (мышь *Nude*) плазмидой с siRNA (и U6-промотором) против XIAP-мишени (продукта гена X-связанного ингибитора апоптоза) сопровождалась заметным подавлением роста опухоли (задержкой в G₁-фазе, уменьшением размера и степени некротизации), ингибированием пролиферации, индукцией апоптоза. Падение уровня экспрессии мишени (на 90%) и активности клеточного роста *in vitro* оценивались, соответственно, RT-PCR, Western blot методами и МТТ-тестом, а степень апоптоза – проточной цитофотометрией и TUNEL-методами. Считают, что это многообещающий инструмент терапии рака [108].

Рак желудка

siRNAs, специфично таргетирующие мутантный *K-ras* (точнее его 19- нуклеотидный участок вблизи 12 кодона), трансфецировались в двух полиэтиленмин- siRNAs-плазмидных рекомбинантных векторах (с отличиями по одному нуклеотиду) внутри подкожно растущих у мышей *Nude* PC-7 и Panc-1 опухолей рака желудка человека (как и в соответствующие культуры тканей). При этом наблюдали эффективное подавление продукции онкогена (анализ RT-PCR и Western blot методов). Ключевое таргетирующее взаимодействие (РНКи) было связано с центральным (вторым) нуклеотидом 12 кодона [112].

В другом случае трансфекция в подкожно трансплантированную мышам *Nude* клеточную линию VxPC3 (как и в случае *in vitro*) векторов с *MAT1*-специфичными siRNAs вызывала сайленсинг этого гена [мишень – 21-нуклеотидный (siRNA)x(*MAT1*) фрагмент днРНК] и значительное подавление роста опухоли (35% снижение клеточной дупликации, задержка в фазах G₀/G₁ *in vivo* [67].

Кроме того, для линии клеток SGC-7901 рака желудка человека (*in-vitro/in-vivo*) показаны ингибирование экспрессии антиапоптотического Bcl-2-фактора, пролиферации, теломеразной активности и усиление апоптоза при использовании Bcl-2-специфичных-siRNAs [46; 47]. Уменьшение клоногенности (опухолеобразования, метастазирования) панкреатических раков в мягком агаре вызывалось нокдаун-специфическими PRL-(1,2)-siRNAs [47; 93]. При генной терапии рака желудка описана эффективная доставка анти-VEGF-C-siRNAs внутри CaCO₃-наночастиц (диаметр – 58 нм), сопровождаемая усилением торможения лимфоангиогенеза, роста опухоли и метастазов (региональных л/у) [47].

Рак легких

Специфичные, устойчиво трансфецируемые и вводимые в рекомбинантных pSilencer3.1 плаزمидях

(*in vitro*; *in vivo*: внутрь введенной п/к мышам *Nude* опухоли), siRNAs успешно таргетировали мРНК мутантного по 12 кодону *K-ras* (своими 9 из 63 нуклеотидов), ингибировали его экспрессию, пролиферацию, рост числа, но усиливали апоптоз истощаемых по мутантному (GGT→GTT) гену клеток линии H441 НМРЛ человека. Уровни мРНК, белка, пролиферация и апоптоз определялись, соответственно, методами RT-PCR, Western blot, МТТ и проточной цитометрией [109]. Сходным образом нокдаун мутантных (но не интактных) мРНК *K-ras* аденовирус-опосредуемыми антисенс-siRNAs (AdH1 и siK-ras(V12)) ингибировал рост и сопровождался случаями полной регрессии этой же, и тем же путем введенной опухоли линии H441 рака легких [110].

Колоректальный рак

Допускают, что siRNAs, специфические к одому из Wnt-рецепторов (*frizzled-7*, *FZD7*), могут быть использованы в качестве анти-CRCs терапевтических агентов (особенно в опухолях с мутациями в *APC* или *CTNNB1* генах), т.к. в некоторых клеточных линиях этого рака (HCT-116, др.), трансфецированных анти-FZD7-siRNAs-плазмидой, значительно понижались транскрипция TCF-фактора (на 20-80%), жизнеспособность и инвазия клеток *in vitro* [102].

Меланома

Взаимодействие анти-Mcl1-siRNAs со своей мишенью, экспрессия которой регулируется митоген-активирующей ERK-киназой, в некоторых устойчивых к анти-Fas-зависимому апоптозу линиях клеток меланомы, и подобно действию циклогексимида, вело к индуцированному анти-Fas моноклональными антителами апоптозу (не связанному с Bcl-2- или Bcl-xL-опосредуемыми путями), активации caspase-9, восстановлению иммунного надзора и элиминации опухолевых клеток [25].

Заключение

О возможных преимуществах практического использования малых РНК в прогнозировании, диагностике и терапии онкологических заболеваний уже сказано выше.

Поэтому, в заключение, заметим, что множество малых РНК (их генов), входя в состав и участвуя в регуляции экспрессии генов и геномов, генетических и эпигенетических изменений клеток организма в норме и патологии (включая канцерогенез), сами, по крайней мере частично, регулируются белками (ферментами), редактированием РНК (например, A→I-дезаминирование – в pre-miRNA-22 человека и мыши [70] и многих miRNAs, таргетирующих 3'-НТО мРНК человека [15]), и др. процессами.

Ранее предлагалась и подробно описывалась гипотетическая схема, согласно которой малые РНК, их мРНК и РНК-мишени, отдельные олигонуклеотидные последовательности генома (а следовательно и множество процессов и явлений в клетке) могут находиться под контролем т.н. нуклеиновых эквивалентов (НЭ; в 15-30 нуклеотидов), сформированных в специальной структуре, «ретранслосоме», при самоорганизации ее компонент – участников процесса т.н. вариабельной Поэпитопной Обратной Трансляции (отдельного эпитопа в 5-10 аминокислот), вПОТ [4-6]. При этом предполагаемая функциональная роль НЭ, переносимых мобильными нуклеотидными векторами или РНП-частицами (скорее, малыми) между ДНК-содержащими клеточными органеллами и цитоплазмой, состояла:

1. В значительно комплементарном (конкурентном) взаимодействии с малыми РНК, их генами (включая делеции, вставки, перестановки) и мРНК и РНК-мишенями, некодирующими регуляторными участками генома (повторами, подвижными элементами), интронами, а также в праймеропосредуемой инициации транскрипции отдельных участков геномов;
2. В реализации/замыкании условно иерархической схемы:
(НЭ→повторы→интроны→экзоны)_n.

Условность схемы связана с включением повторов (по убыванию) в интроны и экзоны с возможным параллелизмом указанных этапов в разных типах клеток и между клетками (соматическими, герминативными, стволовыми, иммунными) [2].

Вышеназванный вПОТ-механизм, вероятно, может быть важен для достижения нескольких целей, и наиболее значимы из них две:

1. Защитная (участие в формировании антиген-специфических участков антител и рецепторов Т- и В-клеток);
2. Генетический-код-формирующая.

В многоклеточном организме поддержание определенного состояния клетки, и, главное, переключение с одного режима на другой (включая патологические – канцерогенез, и т.д.), очевидно, невозможно без участия огромного числа различных специфических сочетаний спектров малых РНК. Что же за процессы создают и регулируют вышеназванные сочетания?

Интересно, что теоретически существует более 10^{13} вариантов последовательностей длиной в 22 нуклеотида [9] (это без учета минорных оснований). Эта длина характерна, одновременно, для средних размеров функционального участка малых РНК (контролирующих экспрессию генов и геномов), и предсказанных в 1993 г. [5] нуклеиновых эквивалентов (НЭ), предположительно, контролирующих (физиологически и эволюционно) и малые РНК и связанные с ними процессы [2; 6].

Число в.н. вариантов сопоставимо и на порядки меньше такового для антител и рецепторов лимфоцитов (до 10^{16} и 10^{18} , соответственно, для В- и Т-лимфоцитов), регулирующих иммунный статус и генетическую целостность организма [11; 12]. Заметим, что суммарная длина в.н. последовательностей на несколько порядков превышает длину эукариотических геномов, которые, выходит, содержат (и контролируют) лишь небольшую часть из потенциально возможных их вариантов.

В то же время природа иммунной системы потенциально позволяет ей контролировать гораздо большее число белковых эпитопов и олигонуклеотидных последовательностей, происхождение которых, очевидно, связано не только с собственным геномом и не только с линейными эпитопами [2; 6].

Литература

1. Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК и эпигенетика // Генетика. – 2006. – 42(9). – Р.1186-99
2. Дейчман А.М. Возвращаясь к вопросу о РНК/Белковой симметрии // Электронный Жрнал «Исследовано в России». – 2007. – С. 1-50 (in Russian). – Р. 1-41 (in English); (<http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2007/149.pdf>).
3. Дейчман А.М. Гипотетические корневые механизмы метаболизма генома формируют контуры новой парадигмы // Ст.-П.: Интеллектуальный Форум «Открытая Дверь» (ФГУП НИИ ПММ). Новые концепции естествознания. – 2007. – С. 260-7.
4. Дейчман А.М. Гипотетические механизмы формирования гипервариабельных и консервативных олигонуклео-

Таким образом, уточним (очерчен некий триумвират):

1. Есть клеточные и вирусные геномы, которые содержат лишь малую часть из потенциально возможных вариантов регуляторных и регулируемых олигопоследовательностей (среди которых и малые РНК);
2. Есть иммунная система, контролирующая на порядки большее число вариантов линейных и конформационных аминокислотных эпитопов (а также соответствующих им и других олигопоследовательностей);
3. Наконец, есть гипотетический механизм (вПОТ), посредством которого любые эпитопы могут регулировать свою экспрессию (физиологическую; возможно, также, онто- и филогенетическую) и получать ретранслируемые нуклеотидные выражения (т.е. НЭ-ты – как информационно-пластический материал), используемые, далее, как для различных в.н. видов экспрессии, так и для защиты от поврежденных собственных и инородных белково-нуклеиновых агентов. Ясно, что если этот механизм поддержания фенотипического равновесия [3] существует, – а другого подобного механизма-посредника с элементами самоорганизации, сравнимого по своей способности сопряженно контролировать взаимосоответствие между олигоструктурами и аминокислотной и нуклеотидной природы не предложено, – он должен быть мостиком, одновременно и ограничивающим и генерирующим протекающие в целом геноме и его частях (включая иммунокомпетентную) процессы поддержания динамически изменяющейся эпигеномной и генетической целостности.

Очевидно, НЭ, по отношению к малым РНК и другим регуляторным единицам (среди которых и гены), способны решать т.н. проблему «регуляции регуляторов» относительно замкнутой системы целого генома. В этой системе, скорее всего, и при некотором упрощении, регулируется экспрессия не только сочетаний отдельных белков, но и входящих в их состав индивидуальных/наборов эпитопов. А в контексте целого генома, НЭ-ты (потенциально – новая минимальная генетическая единица), вероятно, могут оказаться не только информационно-регуляторным, но и тем пластическим материалом, из которого, собственно, по небольшим точечным и олигонуклеотидным частям формируются и гены и целые части генома. Следующий отсюда вывод (принципиально доступный проверке) состоит, в частности, в том, что, скорее всего, не должно быть таких, по крайней мере глобальных, эпигенетических изменений (в том числе при онкогенезе), которые бы не сопровождалась какими-либо временными (ненаследуемыми и наследуемыми) или стойко наследуемыми изменениями в целом геноме – прежде всего, в его регуляторной (повторы), некодирующей части, точечные и другие нуклеотидные флуктуации в которой (в качестве контроля), обычно не исследуются.

тидных участков генома. Возможные перспективы//Российский Биотерапевтический Журнал. – 2007. – №3. – С. 51-60.

5. Дейчман А.М. Один из вариантов точечных мутаций, возможно, запускается поэпитопной обратной трансляцией. Гипотетическая концепция // М.: Рукопись деп. в ВИНТИ. – 1993. – №1502-B93. – С. 56.
6. Дейчман А.М., Цой В.Ч., Барышников А.Ю. Редактирование РНК. Гипотетические механизмы // М.: «Практическая Медицина». – 2005. – Р. 265 in English. – С. 302 in Russian (www.medprint.ru).
7. Кленов М.С., Гвоздев В.А. Формирование гетерохроматина: роль коротких РНК и метилирования ДНК // Биохимия. – 2005. – 70(11). – С. 1445–58.
8. Рязанский С.С., Гвоздев В.А. Короткие РНК и канцерогенез // Биохимия. – 2008. – 73(5). – С. 640–55.
9. Сергеев А. МикроРНК (miRNA): механизм действия и биологические функции // Электронн. Журнал «Биология и Медицина». – 2005. – (http://medbiol.ru/medbiol/rna_interf/0003f69d.htm).
10. Спириин А.С. Биосинтез белков, РНК-Мир и происхождение жизни // Вестник Российской Академии Наук. – 2001. – 71(4). – С. 320-328 (<http://vivovoco.rsl.ru/vv/journal/vran/aspirin/asp...>).
11. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология // М.: Медицина. – 2000. – С. 432.
12. Ярилин А.А. Основы иммунологии // М.: Медицина. – 1999. – С. 608.
13. Bandres E., Cubedo E., Agirre X. et al. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. Mol Cancer. – 2006. – 5. – P. 29.
14. Blenkinson C., Goldstein L.D., Thorne N.P. et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype // Genome Biol. – 2007. – 8(10). – R214.
15. Blow M.J., Grocock R.J., van Dongen S. et al. RNA editing of human microRNAs // Genome Biol. – 2006. – 7(4). – R27.
16. Bohmert K., Camus I., Bellini C. et al. AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development // EMBO J. – 1998. – 17. – P. 170-80.
17. Brouha B., Schustak J., Badge R.M. et al. Hot. L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population // PNAS. – 2003. – 100(9). – P. 5280–5.
18. Calin G.A., Croce C.M. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale // Cancer Res. – 2006. – 66(15). – P. 7390-4.
19. Calin G.A., Croce C.M. Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance // Semin Oncol. – 2006. – 33(2). – P. 167-73.
20. Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia // PNAS. – 2002. – 99(24). – P. 15524-29.
21. Calin G.A., Ferracin M., Cimmino A. et al. MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia // N Engl J Med. – 2005. – 353(17). – P. 1793-1801.
22. Calin G.A., Liu C.G., Sevignani C. et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias // PNAS. – 2004. – 101(32). – P. 11755-60.
23. Carnell A.N. and Goodman J.I. The long (LINEs) and the short (SINEs) of it: altered methylation as a precursor to toxicity // Toxicol. Sci. – 2003. – 75(2). P. 229-35.
24. Chan J.A., Krichevsky A.M., Kosik K.S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells // Cancer Res. – 2005. – 65(14). – P. 6029-33.
25. Chetoui N., Sylla K., Gagnon-Houde J.V. et al. Down-regulation of mcl-1 by small interfering RNA sensitizes resistant melanoma cells to fas-mediated apoptosis // Mol Cancer Res. – 2008. – 6(1). – P. 42-52.
26. Connell R.M., Taganov K.D., Boldin M.P. et al. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response // PNAS. – 2007. – 104(5). – P. 1604-1609.
27. Corson T.W., Gallie B.L. One hit, two hits, three hits, more? Genomic changes in the development of retinoblastoma // Genes Chromosomes Cancer. – 2007. – 46(7). – P. 617-34.
28. Couturier J.P., Root-Bernstein R.S. HIV may produce inhibitory microRNAs (miRNAs) that block production of CD28, CD4 and some interleukins // J. Theor. Biol. – 2005. – 235(2). – P. 169-84.
29. Cullen B.R. Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs // Virus Res. – 2004. – 102(1). – P. 3-9.
30. Dagan T., Sorek R., Sharon E. et al. AluGene: a database of Alu elements incorporated within protein-coding genes. Copyright 2004, Oxford University Press // Nucleic Acids Res. – 2004. – 32(Database issue): D489–D492.
31. Dews M., Homayouni A., Yu D. et al. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster // Nat Genet. – 2006. – 38 (9). – P. 1060-5.
32. Diallo M., Arenz C., Schmitz K. et al. Long endogenous dsRNAs can induce complete gene silencing in mammalian cells and primary cultures // Oligonucleotides. – 2003. – 13(5). – P. 381-92.
33. Du T., Zamore P.D. MicroPrimer: the biogenesis and function of microRNA // Development. – 2005. – 132(21). – P. 4645-52.

34. Duan R., Pak C., Jin P. Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA // *Hum. Mol. Genet.* – 2007. – 16(9). – P. 1124-31.
35. Eis P.S., Tam W., Sun, L. et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas // *PNAS.* – 2005. – 102(10). – P. 3627–3632.
36. Esau C., Kang X., Peralta E. et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation // *J. Biol. Chem.* – 2004. – 279(50). – P. 52361-65.
37. Esquela-Kerscher A., Slack F.J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer // *Nat. Rev. Cancer.* – 2006. – 6(4). – P. 259-69.
38. Esteller M. Cancer epigenomic: DNA metilomes and histone-modification maps // *Nat. Rev. Genet.* – 2007. – 8(4). – P. 286-298.
39. Faller M., Guo F. MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat // *Biochim Biophys Acta.* – 2008. – 1779(11). – P. 663-67.
40. Fukagawa T., Nogami M., Yoshikawa M. et al. Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells // *Nat. Cell Biol.* – 2004. – 6(8). – P. 784-91.
41. Fulci V., Chiaretti S., Goldoni M. et al. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia // *Blood.* – 2007. – 109(11). – P. 4944–4951.
42. Gironella M., Seux M., Xie M.J. et al. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development // *PNAS.* – 2007. – 104(41). – P. 16170-16175.
43. Goodier J.L., Zhang L., Vetter M.R. et al. Line-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex // *Mol. Cell Biol.* – 2007. – 27(18). – P. 6469-83.
44. Guo Y., Guo H., Zhang L. et al. Genomic analysis of anti-hepatitis B virus (HBV) activity by small interfering RNA and lamivudine in stable HBV-producing cells // *J Virol.* – 2005. – 79 (22). – P. 14392-403.
45. Hale C., Kleppe K., Terns R.M. et al. Prokaryotic silencing (psi)RNAs in *Pyrococcus furiosus* // *RNA.* – 2008. – 14(12). – P. 2572-9.
46. Hao J.H., Gu Q.L., Liu B.Y. et al. Inhibition of the proliferation of human gastric cancer cells SGC-7901 in vitro and in vivo using Bcl-2 siRNA // *Chin Med J (Engl).* – 2007. – 120(23). – P. 2105-11.
47. He X.W., Liu T., Chen.YX. et al. Calcium carbonate nanoparticle delivering vascular endothelial growth factor-C siRNA effectively inhibits lymphangiogenesis and growth of gastric cancer in vivo // *Cancer Gene Ther.* – 2008. – 15(3). – P. 193-202.
48. Hébert S.S., Horré K., Nicolai L. et al. Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression // *PNAS.* – 2008. – 105(17). – P. 6415-20.
49. Hoffmann M.J., Schulz W.A. Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer // *Biochem. Cell Biol.* – 2005. – 83(3). – P. 296-321.
50. Hossain A., Kuo M.T., Saunders G.F. Mir-17-5p Regulates Breast Cancer Cell Proliferation by Inhibiting Translation of AIB1 mRNA // *Mol Cell Biol.* – 2006. – 26(21). – P. 8191-201.
51. Hsu P.W., Huang H.D., Hsu S.D. et al. miRNAMap: genomic maps of microRNA genes and their target genes in mammalian genomes // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – 34(Database issue): D135-9.
52. Ionov Y., Peinado M.A., Malkhosyan S. et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a mechanism for colonic carcinogenesis // *Nature.* – 1993. – 363 (6429). – P. 558-561.
53. Izzotti A., Calin G.A., Arrigo P. et al. Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke // *FASEB J.* – 2008. – [Epub ahead of print].
54. Jaenisch R., Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals // *Nat. Genet.* – 2003. – 33(Suppl.). – P. 245–254.
55. Jay C., Nemunaitis J., Chen P. et al. miRNA profiling for diagnosis and prognosis of human cancer // *DNA Cell Biol.* – 2007. – 26 (5). – P. 293–300.
56. Jones N.C., Pevzner P.A. Comparative genomics reveals unusually long motifs in mammalian genomes // *Bioinformatics.* – 2006. – 22(14). – P. e236-42.
57. Jones P.A., Baylin, S.B. The epigenomics of cancer // *Cell.* – 2007. – 128 (4). – P. 683-92.
58. Keshet I., Schlesinger Y, Farkash S. et al. Evidence for an instructive mechanism of de novo methylation in cancer cells // *Nat. Genet.* – 2006. – 38(2). – P. 149–153.
59. Kluiver J., Haralambieva E. et al. // *Genes Chromosomes. Cancer.* – 2006. – 45 (2). – P. 147-53.
60. Kluiver J., Poppema S., de J.D. et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas // *J.Pathol.* – 2005. – 207 (2). – P. 243–249.

61. Kutay H., Bai S., Datta J. *et al.* Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas // *J. Cell Biochem.* – 2006. – 99(3). – P. 671-8.
62. Lee N.S., Kim D.H., Alluin J. *et al.* Functional and intracellular localization properties of U6 promoter-expressed siRNAs, shRNAs, and chimeric VA1 shRNAs in mammalian cells // *RNA.* – 2008. – 14(9). – P. 1823-33.
63. Lee R.C., Feinbaum R.L. and Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* // *Cell.* – 1993. – 75(5). – P. 843-54.
64. Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets // *Cell.* – 2005. – 120(1). – P. 15-20.
65. Li M.J., Rossi J.J. Lentiviral vector delivery of recombinant small interfering RNA expression cassettes // *Methods Enzymol.* – 2005. – 392. – P. 218-26.
66. Li M., Teruya-Feldstein J., Weinberg Robert A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer // *Nature.* – 2007. – 449(7163). – P. 682-688.
67. Liu J.P., Yuan S.Z., Zhang S.N. Experimental study of MAT1 gene silencing mediated by siRNA in pancreatic cancer // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* – 2007. – 87(38). – P. 2719-23.
68. Lu C., Tej S.S., Luo S. *et al.* Elucidation of the small RNA component of the transcriptome // *Science.* – 2005. – 309(5740). – P. 1567-9.
69. Lu J., Getz G., Miska E.A. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers // *Nature.* – 2005. – 435(7043). – P. 834—838.
70. Luciano D.J., Mirsky H., Vendetti N.J., Maas S. RNA editing of a miRNA precursor // *RNA.* – 2004. – 10(8). – P. 1174-77.
71. Maniatakis E., Mourelatos Z. Human mitochondrial tRNA^{Met} is exported to the cytoplasm and associates with the Argonaute 2 protein // *RNA.* – 2005. – 11(6). – P. 849-52.
72. Mattick J.S., Makunin I.V. Small regulatory RNAs in mammals // *Hum Mol Genet.* – 2005. – 14 Spec No 1:R121-32.
73. Mehler M.F., Mattick J.S. Non-coding RNAs in the nervous system // *J Physiol.* – 2006. – 575(Pt 2). – P. 333-41.
74. Metzler M., Wilda M., Busch K. *et al.* High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma // *Genes Chromosomes Cancer.* – 2004. – 39 (2). – P. 167-169.
75. Morin R.D., Aksay G., Dolgosheina E. *et al.* Comparative analysis of the small RNA transcriptomes of *Pinus contorta* and *Oryza sativa* // *Genome Res.* – 2008. – 18(4). – P. 571-84.
76. Murata N., Takashima Y., Toyoshima K. *et al.* Anti-tumor effects of anti-VEGF siRNA encapsulated with PLGA microspheres in mice // *J Control Release.* – 2007. – 126(3). – P. 246-54.
77. Paddison P.J., Caudy A.A., Sachidanandam R. *et al.* Short hairpin activated gene silencing in mammalian cells // *Methods Mol Biol.* – 2004. – 265. – P. 85-100.
78. Poliseno L., Tuccoli A., Mariani L. *et al.* MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVEC // *Blood.* – 2006. – 108(9). – P. 3068-71.
79. Perucho M. Tumors with microsatellite instability: many mutations, targets and paradoxes // *Oncogene.* – 2003. – 22(15). – P. 2223-25.
80. Ruby J.G., Jan C., Player C. *et al.* Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans* // *Cell.* – 2006. – 127(6). – P. 1193-207.
81. Rinn J.L., Kertesz M., Wang J.K. *et al.* Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs // *Cell.* – 2007. – 129(7). – P. 1311-23.
82. Ro S., Song R., Park C. *et al.* Cloning and expression profiling of small RNAs expressed in the mouse ovary // *RNA.* – 2007. – 13(12). – P. 2366-80.
83. Rodriguez A., Vigorito E., Clare S. *et al.* Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function // *Science.* – 2007. – 316 (5824). – P. 608—11.
84. Sai Lakshmi S., Agrawal S. piRNABank: a web resource on classified and clustered Piwi-interacting RNAs // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – 36(Database issue): D173-7.
85. Schuettengruber B., Chourrout D., Vervoort M. *et al.* Genome regulation by polycomb and trithorax proteins // *Cell.* – 2007. – 128 (4). – P. 735—45.
86. Schulz W.A. L1 retrotransposons in human cancers // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2006. – 2006(1). – P. 83672.
87. Sheedy F.J., O'Neill L.A. Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation // *Ann Rheum Dis.* – 2008. – 67(Suppl) 3:iii 50-55.
88. Shivdasani R.A. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation // *Blood.* – 2006. – 108(12). – P. 3646-3653.
89. Smalheiser N.R., Torvik V.I. Alu elements within human mRNAs are probable microRNA targets // *Trends Genet.* – 2006. – 22(10). – P. 532-6.

90. *Sohail F., Tavazoie S.F., Alarcón C. et al.* Endogenous human microRNAs hat suppress breast cancer metastasis // *Nature*. – 2008. – 451 (7175). – P. 147-152.
91. *Sonoki T., Iwanaga E., Mitsuya H. et al.* Insertion of microRNA-125b-1, a human homologue of lin-4, into a rearranged immunoglobulin heavy chain gene locus in a patient with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia // *Leukemia*. – 2005. – 19(11). – P. 2009-10.
92. *Spadafora C.* Endogenous reverse transcriptase: a mediator of cell proliferation and differentiation // *Cytogenet. Genome Res.* – 2004. – 105(2-4). – P. 346-50.
93. *Stephens B., Han H., Hostetter G. et al.* Small interfering RNA-mediated knockdown of PRL phosphatases results in altered Akt phosphorylation and reduced clonogenicity of pancreatic cancer cells // *Mol Cancer Ther.* – 2008. – 7(1). – P. 202-10.
94. *Thai T.H., Calado D.P., Casola S. et al.* Regulation of the germinal center response by microRNA-155 // *Science*. – 2007. – 316(5824). – P. 604–608.
95. *Ting A.H., McGarvey K.M., Baylin S.B.* The cancer epigenome-components and functional correlates // *Genes Dev.* – 2006. – 20(23). – P. 3215-3231.
96. *Vagin V.V., Sigova A., Chengjian Li, et al.* A Distinct Small RNA Pathway Silences Selfish Genetic Elements in the Germline // *Science*. – 2006. – 313(5785). – P. 320-4.
97. *Voorhoeve P.M., le Sage C., Schrier M. et al.* A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors // *Cell*. – 2006. – 124(6). – P. 1169-81.
98. *Wang G., van der Walt J.M., Mayhew G. et al.* Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein // *Am J Hum Genet.* – 2008. – 82(2). – P. 283-9.
99. *Wang T., Lerer I., Gueta Z. et al.* A deletion/insertion mutation in the BRCA2 gene in a breast cancer family: a possible role of the Alu-polyA tail in the evolution of the deletion // *Genes Chromosomes Cancer*. – 2001. – 31(1). – P. 91–95.
100. *Wightman B., Ha I., Ruvkun G.* Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans* // *Cell*. – 1993. – 75(5). – P. 855-62.
101. *Wu W.D., Fang C.H., Yang Z.X. et al.* Effects of RNA interference on epidermal growth factor receptor expression in breast cancer cells: a study in tumor-bearing nude mice // *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. – 2008. – 28(1). – P. 60-4.
102. *Ueno K., Hiura M., Suehiro Y. et al.* Frizzled-7 as a potential therapeutic target in colorectal cancer // *Neoplasia*. – 2008. – 10(7). – P. 697-705.
103. *Upadhyay R., Bawankar P., Malhotra D., Patankar S.* A screen for conserved sequences with biased base composition identifies noncoding RNAs in the A-T rich genome of *Plasmodium falciparum* // *Mol Biochem Parasitol.* – 2005. – 144(2). – P. 149-58.
104. *Yanaihara N., Caplen N., Bowman E. et al.* Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis // *Cancer Cell*. – 2006. – 9(3). – P. 189-98.
105. *Yang Z., Cloud A., Hughes D., Johnson L.F.* Stable inhibition of human thymidylate synthase expression following retroviral introduction of an siRNA gene // *Cancer Gene Ther.* – 2006. – 13(1). – P. 107-14.
106. *Yu J., Wang F., Yang G.H. et al.* Human microRNA clusters: Genomic organization and expression profile in leukemia cell lines // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2006. – 349(1). – P. 59-68.
107. *Zeng Y., Cullen B.R.* Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells // *RNA*. – 2003. – 9(1). – P. 112-23.
108. *Zhang Y., Wang Y., Gao W. et al.* Transfer of siRNA against XIAP induces apoptosis and reduces tumor cells growth potential in human breast cancer in vitro and in vivo // *Breast Cancer Res Treat.* – 2006. – 96(3). – P. 267-77.
109. *Zhang Z.P., Jiang G.C., Yang F. et al.* Study of growth inhibition of lung cancer cells by siRNA targeting mutant K-ras gene in vitro and in vivo // *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. – 2007. – 45(18). – P. 1267-70.
110. *Zhang Z., Jiang G., Yang F., Wang J.* Knockdown of mutant K-ras expression by adenovirus-mediated siRNA inhibits the in vitro and in vivo growth of lung cancer cells // *Cancer Biol Ther.* – 2006. – 5(11). – P. 1481
111. *Zhao T., Li G., Mi S. et al.* A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // *Genes Dev.* – 2007. – 21(10). – P. 1190-203.
112. *Zhu H., Liang Z.Y., Ren X.Y., Liu T.H.* Small interfering RNAs targeting mutant K-ras inhibit human pancreatic carcinoma cells growth in vitro and in vivo // *Cancer Biol Ther.* – 2006. – 5(12). – P. 1693-8.



К 75-ЛЕТИЮ АКАДЕМИКА ОЛЕГА НИКОЛАЕВИЧА ЧУПАХИНА

9 июня 2009 года исполняется 75 лет действительному члену Российской академии наук, доктору химических наук, профессору Олегу Николаевичу Чупахину.

О.Н. Чупахин – один из самых ярких химиков-органиков, создатель крупной научной школы. Его работы в области органической, гетероциклической и медицинской химии получили широкое признание как в нашей стране, так и за рубежом.

Олег Николаевич Чупахин окончил в 1957 году с отличием химико-технологический факультет Уральского политехнического института (УПИ), затем аспирантуру, после чего работал на кафедре органической химии УПИ. В 1976 г. защитил докторскую диссертацию «Нуклеофильное замещение водорода в азинах» и принял руководство кафедрой органической химии и проблемной лабораторией физиологически активных веществ. В 1989 году возглавил Отдел тонкого органического синтеза Института органической химии УрО РАН, а с 1993 по 2004 год – директор созданного им Института органического синтеза Уральского отделения РАН. В 1987 году был избран членом-корреспондентом АН СССР, в 1992 году – академиком РАН.

О.Н. Чупахин является основателем нового научного направления: под его руководством выполнен обширный цикл пионерских исследований реакций нуклеофильного ароматического замещения водорода (S_N^H), считавшихся до этого «необычными» или вообще мало реальными. В результате всестороннего изучения этих реакций, их кинетики, интермедиатов, ориентационных эффектов, аномальных и побочных процессов сформулирована концепция нуклеофильного замещения водорода как фундаментального свойства ароматических систем и продемонстрированы широчайшие синтетические возможности S_N^H превращений. Опубликован первый в мировой литературе обзор (*Успехи химии*, 1976, **45**, 908-937) и первая монография (O.N. Chupakhin, V.N. Charushin, H.C. van der Plas "Nucleophilic Aromatic Substitution of Hydrogen" N.Y., Academic Press, 1994, 368 p.), в котором сформулированы основы теории и практики нуклеофильного ароматического замещения водорода, обобщены универсальные приемы некатализируемых металлами прямых сочетаний C-Csp³, C-Csp², C-Csp, C-N, C-O, C-P, C-S путем атаки нуклеофила на незамещенный атом дефицитных гетероаренов и аренов.

Разработаны оригинальные, в том числе принципиально новые синтетические методы конструирования разнообразных органических соединений, предложены одностадийные методы построения сложных гетероциклов, в том числе каркасных и алкалоидоподобных необычных ансамблей гетаренов и супрамолекулярных структур. Сделан весомый вклад в химию гетероароматических катионов, выявлены черты их сходства и отличия по сравнению с арениевыми ионами.

Помимо этого, академик О.Н. Чупахин активно занимается химией фторсодержащих соединений, в том числе гетероциклических, химическими аспектами охраны окружающей среды, успешно работает в области создания лекарственных веществ: им открыта новая группа противовирусных препаратов с широким спектром действия (препарат «триазавирин» проходит клинические испытания), разработана технология антибактериального препарата «пепфлаксаин», внедряется новое противоопухолевое средство «лизомустин», ведутся исследования кардиотропных, противотуберкулезных веществ и др.

Отличительными чертами научной деятельности О.Н. Чупахина являются творческое начало, тесное взаимодействие с зарубежными партнерами (учеными Германии, Польши, Португалии, Испании, США и др.), а также активное привлечение научной молодежи. Он явился инициатором проведения в 1998 г. Международной конференции по органической химии, посвященной 100-летию со дня рождения академика И.Я. Постовского, а также ставших ежегодными молодежных научных школ по органической химии.

О.Н. Чупахин широко известен химической общественности, его монография «Нуклеофильное ароматическое замещение водорода», изданная в США, постоянно цитируется в литературе, предложенный им для этих реакций символ S_N^H получил широкое хождение в мировой литературе. Он автор 11 монографий, более 500 статей и научных сообщений, более 200 патентов и изобретений. Чупахин О.Н. ведет большую научно-педагогическую работу в качестве заведующего кафедрой органической химии Уральского государственного технического университета (УГТУ-УПИ). Его работы используются при чтении курсов в МГУ, Ростовском, Новосибирском, Уральском техническом и других госуниверситетах, внесены в учебники и учебные пособия.

Большое внимание уделяется им подготовке кадров высшей квалификации. Среди его учеников более 40 кандидатов и 9 докторов наук. Им организованы и успешно работают на базе ИОС УрО РАН филиалы кафедр органической химии Уральского государственного и Уральского государственного технического университетов, лаборатории высокомолекулярных соединений УрГУ.

Чупахин О.Н. – председатель Объединенного ученого совета УрО РАН по химическим наукам, председатель специализированного совета по защитах докторских диссертаций, член Национального комитета российских химиков, член редколлегии «Журнала органической химии», член редакционного совета «Вестника Уральского отделения РАН», член Международного гетероциклического общества, член Международного союза антивирусных соединений, член Межведомственного научного совета по конвенционным проблемам химического и биологического оружия.

Чупахин О.Н. является лауреатом премии Совета Министров СССР (1990г.), премии Всесоюзного химического общества имени Д.И. Менделеева, премии Международного академического издательства «Наука». В 2004 г. Олег Николаевич стал лауреатом премии имени академика Н.Д. Зелинского, учрежденной Российской академией наук, и лауреатом премии имени академика И.Я. Постовского, учрежденной Уральским отделением РАН, в 2008 г. – лауреатом премии имени В.Н.Татищева и Г.В. де Геннина. В 2006 г. О.Н. Чупахину присуждена престижная Демидовская премия, а в 2007 г. Фонд содействия отечественной науке назвал Олега Николаевича победителем в конкурсе 2007 года в номинации «Выдающиеся ученые РАН».

Олег Николаевич Чупахин награжден Орденами Дружбы и Почета.

Редколлегия

«Российского Биотерапевтического Журнала»

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БКС – бинарная каталитическая система
в/б – внутривенно
в/в – внутривенно
ГК – гепатоцеллюлярная карцинома
 бГК – быстрорастущая дедифференцированная гепатоцеллюлярная карцинома
 мГК – медленно растущая гепатоцеллюлярная карцинома
ГПВ/GPV – гликопептидная противоопухолевая вакцина /glycopeptide cancer vaccine
ЗНО – злокачественные новообразования
ЛТ – лучевая терапия
МКА – моноклональные антитела
ММ – множественная миелома
МРЛ – мелкоклеточный рак легкого
МРТ – магнитно-резонансная томография
НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого
НПАВ – неионизирующие поверхностно-активные вещества
НПТ – наилучшая поддерживающая терапия
НХЛ – неходжкинская лимфома
ОбО – объективный ответ
ОО – отсутствие ответа
ОЦК – объем циркулирующей крови
РМЖ – рак молочной железы
 МР РМЖ – местнораспространенный рак молочной железы
 ОИФ РМЖ – отечно-инфильтративная форма рака молочной железы
РЭС – ретикулоэндотелиальная система
ПЗ – прогрессирование заболевания
ПО – полный ответ
ПОПР – полиоксипропилен
ПФОС – перфторорганические соединения
ПХТ – полихимиотерапия
КРР – колоректальный рак
РКТ – рентгеновская компьютерная томография
РЛ – рак легкого
РМЖ – рак молочной железы
РПЖ – рак поджелудочной железы
РЭ – рецепторы эстрогенных гормонов
РЭМП – расширенная экстирпация матки с придатками
СЗП – свежемороженая плазма
СПЖ – средняя продолжительность жизни
УЗКТ – ультразвуковая компьютерная томография
ХЛЛ – хронический лимфоцитарный лейкоз
ХТ – химиотерапия
ЧО – частичный ответ
ЭМП – экстирпация матки с придатками
LLC – lung carcinoma Lewis
Mw – molecular weight (молекулярный вес)
HER – human epidermal growth factor receptor
TGF – Transforming Growth Factors (трансформирующие факторы роста)
VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor